

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-92569

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>C 12 N 9/04  
1/14  
1/16

識別記号

庁内整理番号

7236-4B  
6712-4B  
6712-4B

⑭ 公開 昭和61年(1986)5月10日

※審査請求 未請求 発明の数 12 (全53頁)

⑮ 発明の名称 オキシドリダクターゼの製造法

⑯ 特 願 昭60-166622

⑰ 出 願 昭60(1985)7月27日

優先権主張 ⑱ 1984年7月27日 ⑲ 欧州特許機構(E P) ⑳ 84201114.0

㉑ 発 明 者 アドリアヌス マリヌ オランダ国ロッテルダム、バーゲル フェーブルド モ  
ス レデボア ンティニブレイン 8

㉒ 発 明 者 ヤ シ マ ー ト オランダ国モンスター、モレンストラート 2

㉓ 発 明 者 コルネリス テオドル オランダ国マースルイス、ハゲドールン 18  
ス ペリプス㉔ 出 願 人 ユニリーバー ナーム オランダ国ロッテルダム、バージミースターズ、ヤコブブ  
ローゼ ベンノートシ レーン 1  
ヤーブ㉕ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名  
最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

## 1. 発明の名称

オキシドリダクターゼの製造法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 適当な条件下で微生物を培養し、任意には生成した酵素を濃縮しついでこの濃縮酵素を公知方法により集取してオキシドリダクターゼを製造する方法において、組換え DNA 技術により得、そしてオキシドリダクターゼを産生しうる微生物を使用することを特徴とする、上記方法。

## (2) 微生物は

- 1) アルコールオキシダーゼ
- 2) アルキルアミンオキシダーゼおよびベンジルアミンオキシダーゼを含むアミンオキシダーゼ、
- 3) D-アラニンオキシダーゼ、リジンオキシダーゼを含むアミノ酸オキシダーゼ、
- 4) コレステロールオキシダーゼ、
- 5) 尿酸オキシダーゼ、
- 6) キサンチンオキシダーゼ、

7) クロロパーオキシダーゼ、および

8) アルデヒドオキシダーゼ

から成る群から選択した少なくとも1種の酵素を産生しうる、特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) 微生物はカビ又は酵母である、特許請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

(4) カビ又は酵母はアスペルギルス属、カンジダ属、ゲオトリカム属、ハンセヌラ属、レンジト属、ナドソニア属、ピチア属、ボリア属、ポリボラス属、サツカロミセス属、スポロボロミセス属、トルロプシス属、トリコスボラ属およびゼンデラ属から成る群から選択する、特許請求の範囲第3項記載の方法。

(5) カビ又は酵母はアスペルギルス・ジャポニカス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリゼ、カンジダ・ボイジニ、ハンセヌラ・アノマラ、ハンセヌラ・ポリモーフア、ハンセヌラ・ウイングイ、クローケラ・sp. 2201およびピチア・パストリス種から選択する、特許請求の範囲第4項記載の方法。

(6) 微生物はジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素を産生することができ、ホルムアルデヒドからジヒドロキシアセトンの生成を促進する酵素を産生する、特許請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載の方法。

(7) 特許請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載の方法により得たオキシドリダクターゼを酸化方法に使用すること。

(8) 漂白活性を有する洗剤組成物又は硬質面洗浄組成物を含む漂白組成物であつて、特許請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載の方法により得たオキシドリダクターゼおよびその基質を含有することを特徴とする、上記組成物。

(9) 組換えDNA技術により製造でき、かつ特許請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載の方法に使用するのに適したオキシドリダクターゼを産生しうる、微生物。

(10) 組換えDNA技術により製造でき、かつ特許請求の範囲第6項記載の方法に使用するのに適したジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素を産生し得、

ダクターゼをコードするDNA配列。

(14) アルコールオキシダーゼをコードする、特許請求の範囲第13項記載のDNA配列。

(15) ポリペプチド1-664(MOX)をコードする第11A+11Bに示したDNA配列1-1992(MOX遺伝子)を有し、そのアミノ酸配列は第11A+11Bに示される、特許請求の範囲第14項記載のDNA配列。

(16) オキシドリダクターゼをコードする構造遺伝子および特定の微生物又はある群の微生物中構造遺伝子の発現を調節する1種以上の別のDNA配列を含む、DNA配列の組み合わせ。

(17) 第11A図に示した上流DNA配列-1から約-1500の少なくとも一部および/又は第11B図に示した下流DNA配列1993から約3260(MOX遺伝子の制御領域)の少なくとも一部を含む、特許請求の範囲第16項記載のDNA配列の組み合わせ。

(18) 第11A図に示した上流DNA配列の少なくともポリヌクレオチド-1052から-987を含む、

さらにオキシドリダクターゼを産生し得る、微生物。

(19) 特許請求の範囲第9項記載の形質転換微生物の調製方法において、構造遺伝子の発現を調節する1種以上の他のDNA配列と共にオキシドリダクターゼをコードするDNA配列をエピソードベクターを介して微生物に導入するか又はゲノムにて統合させて、微生物をオキシドリダクターゼ産生可能にさせることを特徴とする、上記方法。

(20) 特許請求の範囲第10項記載の形質転換微生物の調製方法において、構造遺伝子の発現を調節する1種以上の別のDNA配列と共にジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素をコードするDNAをエピソードベクター又はゲノム中の統合を介して導入し、微生物をジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素(DHAS酵素)を産生させ得ることを特徴とする、上記方法。

(21) 天然のDNAおよび/又はcDNAおよび/又は化学的に合成したDNAから組換えDNA技術により得ることができることを特徴とする、オキシドリ

ダクターゼをコードするDNA配列の組み合わせ。

(22) 第11A図に示した少なくともポリヌクレオチド-1052から-987の欠失により得ることができる変性MOXプロモーター配列を含む、特許請求の範囲第17項記載のDNA配列の組み合わせ。

(23) 第18A図+18B図に示した上流DNA配列-1から約-2125の少なくとも一部および/又は第18C図に示した下流DNA配列2107から約2350の少なくとも一部( DAS遺伝子の制御領域)を含む、特許請求の範囲第16項記載のDNA配列の組み合わせ。

(24) 第18A図に示した上流DNA配列の少なくともポリヌクレオチド-1076から-937を含む、特許請求の範囲第20項記載のDNA配列の組み合わせ。

(25) 第18A図に示した少なくともポリヌクレオチド-1076から-937の欠失により得ることができる変性DASプロモーター配列を含む、特

特許請求の範囲第20項記載のDNA配列の組み合わせ。

② 真核生物、カビ又は酵母のオキシドリダクターゼをコードする構造遺伝子を含む、特許請求の範囲第16項記載のDNA配列の組み合わせ。

③ ハンセスラ属、遅ましくはB.ポリモーファの酵母のオキシドリダクターゼをコードする構造遺伝子を含む、特許請求の範囲第23項記載のDNA配列の組み合わせ。

④ オキシドリダクターゼをコードする構造遺伝子はアルコールオキシダーゼをコードする、特許請求の範囲第16項記載のDNA配列の組み合わせ。

⑤ 構造遺伝子はポリペプチド1-664(MOX)をコードする第11A図+11B図に示したDNA配列1-1992(MOX遺伝子)であり、そのアミノ酸配列は第11A図+11B図に示される、特許請求の範囲第25項記載のDNA配列の組み合わせ。

⑥ DHASをコードする構造遺伝子を含む、特許請求の範囲第16項記載のDNA配列の組み合わせ。

約-1500の少なくとも一部又は第18A図に示すDAS遺伝子のレギュロン-1から約-2125の少なくとも一部から成る群から選んで使用し、その修飾はレギュロン機能に修復を与えず、そして任意にはターミネータは第11B図に示すMOX遺伝子のターミネータ1993から約3260の少なくとも一部又は第18B図に示すDAS遺伝子のターミネータ2110から約2350の少なくとも一部から成る群から選択して使用し、その修飾はターミネーター機能に修復を与えないことを特徴とする、上記DNA配列の組み合わせ。

⑦ ハンセスラ酵母、特にハンセスラ・ポリモーファの形質転換に適する、特許請求の範囲第31項記載のDNA配列の組み合わせ。

⑧ サツカロミセス酵母、特にサツカロミセス・セレビシエの形質転換に適する、特許請求の範囲第31項記載のDNA配列の組み合わせ。

⑨ 特異的酵素又は他のタン白質をコードする構造遺伝子は、その特異的酵素又はその他のタン白質がペルオキシソームすなわちこの微生物宿主の

⑩ 第18B図+18C図に示すアミノ酸配列を有するDHASをコードする構造遺伝子を含む、特許請求の範囲第27項記載のDNA配列の組み合わせ。

⑪ 組換えDNA技術により、DNA配列を変性し、オキシドリダクターゼをコードする機能又はその制御機能を保持する、特許請求の範囲第16項から第28項のいずれか1項に記載のDNA配列の組み合わせ。

⑫ ある特定の宿主微生物の後代に上記組み合わせを安定的に遺伝させうる1種以上のDNA配列を含む、特許請求の範囲第16項から第29項のいずれか1項に記載のDNA配列の組み合わせ。

⑬ 特異的酵素又はその他のタン白質を産生するのに微生物宿主の形質転換に適するDNA配列の組み合わせで、そのDNA配列の組み合わせはレギュロン、その特異的酵素又はその他のタン白質をコードする構造遺伝子および任意にはターミネーターを含む組み合わせであつて、レギュロンは第11A図に示すMOX遺伝子のレギュロン-1から

同一ミクロボディにトランスロケーションするように、その機能を修復せず、この特異的酵素又はその他のタン白質を修飾するMOX(第11A+11B図)をコードする構造遺伝子由来のDNA配列を含む、特許請求の範囲第31項記載のDNA配列の組み合わせ。

⑭ ジヒドロオキシシンターゼ酵素をコードするDNA配列であつて、天然のDNAおよび/又はcDNAおよび/又は化学合成したDNAから組換えDNA技術により得ることができる、上記DNA配列。

⑮ ポリペプチド1-702(DHAS)をコードする、第18B+18C図に示すDNA配列1-2106(DAS遺伝子)を有し、そのアミノ酸配列は第18B+18C図に示す、特許請求の範囲第35項記載のDNA配列。

⑯ 特定の微生物又は微生物群に構造遺伝子の発現を調節する1種以上のDNA配列およびジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素をコードするDNA配列の組み合わせ。

⑰ 特許請求の範囲第36項記載のDNA配列

(DAS 遺伝子) および第 18A + 18B 図に示す上流 DNA 配列 - 1 から約 - 2125 の少なくとも一部および / 又は第 18C 図に示す下流 DNA 配列 2107 から約 2350 の少なくとも一部 (DAS 遺伝子の制御領域) および / 又は第 11A 図に示す上流 DNA 配列 - 1 から約 - 1500 の少なくとも一部および / 又は第 11B 図に示す下流 DNA 配列 1993 から約 3260 の少なくとも一部 (MOX 遺伝子の制御領域) から成る、特許請求の範囲第 37 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(39) 第 18A 図に示す上流 DNA 配列の少なくともポリヌクレオチド - 1076 から - 937 又は第 11A 図に示す上流 DNA 配列の少なくともポリヌクレオチド - 1052 から - 987 をそれぞれ含む、特許請求の範囲第 38 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(40) 適当な条件下で微生物を培養し、任意にはポリペプチドを濃縮しそして公知方法でそれを集取することにより、タン白質や酵素の如きポリペプチドを製造する方法において、組換え DNA 技術に

から選択する、特許請求の範囲第 40 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の方法。

(41) カビ又は酵母はアスペルギルス・ジャポニカス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリゼ、カンジダ・ボイジニ、ハンセンラ・アノマラ、ハンセンラ・ポリモーフア、ハンセンラ・ウインゲイ、クロツケラ sp. 2201 およびピチア・バストリスから選択する、特許請求の範囲第 43 項記載の方法。

(42) 微生物はハンセンラ・ポリモーフアである、特許請求の範囲第 44 項記載の方法。

(43) 構造遺伝子は、遺伝子産物をペルオキシソームすなわち微生物宿主の均等マイクロボディにトランスロケーションする 1 種以上の DNA 配列を有する、特許請求の範囲第 40 項から第 45 項のいずれか 1 項に記載の方法。

(44) DNA 配列は MOX 遺伝子又はペルオキシソームすなわちマイクロボディに MOX トランスロケーションするその一部から成る、特許請求の範囲第 46 項記載の方法。

より得、かつこのポリペプチドをコードする構造遺伝子を有する微生物を使い、その構造遺伝子の発現はレギュロンの調節下で行ない、そのレギュロンはプロモーターおよびハンセンラ・ポリモーフア CBS 4732 の MOX 遺伝子の少なくとも - 1052 から - 987 又はハンセンラ・ポリモーフア CBS 4732 の DAS 遺伝子の - 1076 から - 937 領域、又は他のメチルトロフィックのカビ又は酵母の相当する領域、又はこれらの任意の領域の有効修飾から成ることを特徴とする、上記ポリペプチドの製造法。

(45) プロモーターはハンセンラ・ポリモーフア由来である、特許請求の範囲第 40 項記載の方法。

(46) 微生物はカビ又は酵母である、特許請求の範囲第 40 項又は第 41 項記載の方法。

(47) カビ又は酵母はアスペルギルス属、カンジダ属、ジオトリカム属、ハンセンラ属、レンジト属、ナドソニア属、ピチア属、ボリア属、ポリボラス属、サツカロミセス属、スポロボロミセス属、トルロプシス属、トリコスボラ属およびゼンデラ属

### 3. 発明の詳細な説明

本発明はオキシドリダクターゼの微生物による製造法、漂白剤および / 又は洗剤組成物にこれらの酵素を使用すること、およびオキシドリダクターゼおよび任意にはジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素、およびハンセンラ (H.)・ポリモーフアアルコールオキシダーゼおよび / 又はジヒドロキシアセトンシンターゼ調節配列をコードする DNA 配列により形質転換された微生物に関し、この微生物は本方法に適切に使用できる。

電子受容体として酵素を使用するオキシドリダクターゼは漂白組成物や洗剤組成物に使用するのに適した酵素であり、洗浄又は漂白工程中、漂白剤例えば  $H_2O_2$  をその場で生成するのに使用できる。例えば、

- GB - PS 第 1,225,715 号 (コルギート・バルモリブ社)、グルコースとグルコースオキシダーゼの混合物その他の成分を乾燥粉末洗剤組成物に使用することが記述されている。

- DE - PA 第 2,557,623 号 (ヘンケル & シイ

社)、 $C_1 - C_3$  アルカノールとアルカノールオキシダーゼ、又はガラクトースとガラクトース・オキシダーゼ、又は尿酸とウラトキシダーゼおよびその他の成分を漂白性を有する乾燥洗剤組成物として使用することが記述されている。

- GB - PA 第 2,1 0 1,1 6 7 号 (ユニリーバ社)、 $C_1 \sim C_4$  アルカノールと  $C_1 \sim C_6$  アルカノールオキシダーゼを液体ブリーチとして又は洗剤組成物として使用することが記述されている。

上記アルカノールと酵素は、組成物が水で稀釈するか又は十分に酵素と接触するまで、実質上の反応は呈し得ない。

今まで、天然のオキシダーゼ/酵素は低コストで製造することができないので、洗剤等の大規模の工業的用途に不向きであつた。更に、オキシダーゼ/酵素は洗剤や漂白剤に使用した場合、非生理的条件下で作用させねばならない。さらには洗剤組成物に使用するのに使われてきた天然のオキシダーゼは天然のカタラーゼを伴ない、生成したパーオキシサイドを殆んど直ぐに分解するので、有

微生物又は一層適切な酵素を見出すことを期待したが、成功はまた低かつた。

高収率でおよび/又はカタラーゼの生成を伴わずおよび/または貯蔵や使用中例えば漂白組成物や洗剤組成物にて改良された性質を有するオキシダーゼ酵素の調製方法の需要が明かに存在する。試行錯誤による問題は次の方法により克服することができる。すなわち、適当な条件下で微生物を培養し、望ましくは酵素を濃縮し、濃縮した酵素を公知方法により集取してオキシダーゼ酵素を製造する方法において、組換え DNA 技術により得てオキシダーゼ酵素を産生し得る微生物を使用することを特徴とする方法である。

オキシダーゼの製造法に使用するのに適する微生物は組換え DNA 技術により得ることができるが、特定の微生物又は微生物群にて構造遺伝子の発現を調節する 1 種以上の他の DNA 配列と共に、オキシダーゼをコードする DNA 配列 (所謂構造遺伝子) により微生物を形質転換させ、当該配列を含むエピソードベクターを導入するかあるいは微生物の

効な漂白効果は得られない。したがつて、製造条件下で使用しかつ洗剤や漂白製品の使用に一層適するオキシダーゼ/酵素の需要がある。

これらのオキシダーゼを経済的に有利に製造するために、細胞タンパク質の 20 名まで (フアン・ディケン等、1976) の H・ポリモーフアのアルコールオキシダーゼのように、発酵方法でこれらの酵素の収率を上げる必要がある。

高量の酵素産生新規微生物を見つけること又は改良された性質を有する新規オキシダーゼ酵素を見出す方法はあらゆる種類の微生物をチェックして適切なオキシダーゼを単離すること、ついでそのパーオキシサイド生成能をチェックし、製造条件下および洗剤と漂白製品の使用条件下のその安定性をチェックすることである。いつの日か適当な酵素が見つかるであろうという望みがあつたが、成功は予見できず、多分非常に低いものであろう。

別の方法は、これらのオキシダーゼを生成する天然の微生物を古典的遺伝技術により交雑する試行錯誤方法を適用することであり、一層生産的な

染色体に組みこみ可能な DNA 配列を備えた配列を含むベクターによる。

5' - および 3' - 制御側面領域と共に H・ポリモーフ由来のアルコールオキシダーゼ (EC 1.1.3.13) をコードする構造遺伝子の決定は、本発明の範囲を限定するものではないが、本発明の例として記述する。本発明の精神は、グリセロールオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ等のその他のオキシダーゼの DNA 配列を単離すること、DNA 配列又はその修飾を微生物のゲノムに又は微生物を形質転換するのに使うエピソードベクターに加えることおよびこうして得られた形質転換微生物の培養、ならびに漂白組成にこの酵素を使用することにも適用可能である。

使用する微生物はバチルス属の如きバクテリアやカビも可能であるが、技術的かつ経済的理由から酵母を使うのが望ましい。特に、カビ又は酵母はアスペルギルス属、カンジダ属、ゲオトリカム属、ハンセンラ属、レンジト属、ナドソニア属、

ピチア属、ポリア属、ポリポラス属、サツカロミセス属、スボロポロミセス属、トルロプシス属、トリコスボロン属およびゼンデラ属から選択でき、特にアスペルギルス(A)、ジャボニカス、A・ニガー、A・オリゼー、カンジダ・ボイジニ、B・ポリモーフア、ピチア・パストリスおよびクロツケラ・sp. 2201から選択することができる。後者の名称は特にC・ボイジニの代りに使う。

多くの $C_1$ 質化性酵母は過去10年間単離されており、ハンセヌラ・ポリモーフアやカンジダ・ボイジニについては、メタノール代謝が広く研究されてきた(ビーンハイス等、1983)。

この代謝の第1工程はメタノールがMOXにより酸媒されて、ホルムアルデヒドと $H_2O_2$ に酸化される。ホルムアルデヒドは更にホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼおよび蟻酸デヒドロゲナーゼの作用により酸化される。 $H_2O_2$ はカタラーゼにより分解されて水と酸素になる。

別の形では、メタノールは細胞物質に同化される。ホルムアルデヒドに転換後、この生成物はキ

経済的に行なうことができる。

メタノールで生育させてアルコールオキシダーゼ(MOX)をコードする遺伝子の活性化後、大きなミクロボディすなわちペルオキシソームが生成される。グルコース生育細胞はほんの僅かのペルオキシソームを含むが、内部容量の80%までの細胞が活性化状態でペルオキシソームに置き換る。メタノールがホルムアルデヒドと $H_2O_2$ に転換し、かつ $H_2O_2$ の分解はこれらのペルオキシソームにおいておきることが分つたが、更にホルムアルデヒドの酸化又は同化は大概の場合、細胞質にておきる。このプロセスは有毒生成物の、いくつかの細胞プロセスの強力な同等活性化の、およびこのプロセスに包含される少なくとも2つの酵素の選択的トランスロケーションの区画分けの完全な例である。

メタノール代謝に関与する殆どどの酵素は精製かつ特性化される(サーム、1977、ピストリック等、1981)。特に、メタノールオキシダーゼ(BC1, 1, 3, 13)は詳細に研究された。

シルロースモノリン酸塩経路を介して炭水化物に固定される。ジヒドロキシアセトンシンターゼ(DHAS)はこの同化工程上重要な役割をしている。

MOX、蟻酸デヒドロゲナーゼ、ホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼ、DHASおよびカタラーゼの出現は例えば0.5%グルコースで、グルコース抑制を受ける。しかし、MOXの合成は、これらの条件下でまだ十分に抑制される(ロッゲンキャンパ等、1984年)、DHASの合成とは反対に、低濃度グルコース(0.1%)における生育により活性化される。

調節、すなわち当該ポリペプチドの遺伝子をスイッチオン又はオフにする可能性が望ましい。と言うのは、必要な時、糧食の如き適当な基質を選択して、バイオマスの生産を可能にし、また必要に応じ、メタノール又はメタノールと他の炭素源混合物を使つて、目的のポリペプチドを生産することができるからである。メタノールはやゝ廉価な基質であるから、ポリペプチドの生産は非常に

それは約74 KdのMr値を有する同一モノマーから成るオクタマーでありかつ置換基としてFADを含む。今まで、分裂可能なトランスロケーションのシグナル配列は検出されていない。生体内および試験管内合成物による電気泳動研究(ロアおよびブローベル、1983)又はミクロソーム膜の存在下の試験管内合成(ロッゲンキャンパ等、1984)から結論された。

活性化条件下で、20%までの細胞タン白質がMOXから成る。

#### 材料および方法

##### a) 微生物および培養条件

ハンセヌラ・ポリモーフア CBS 4732はジェイ・ビー・ディケン博士(デルフト工業大学、オランダ)から入手した。細胞は300 mlの最小培地を含有する1ℓエルレンマイヤーフラスコにて37℃生育させ(ビーンハイス等、1978)、指示通り、0.5% (v/v)メタノール又は0.5% (v/v)エタノールを補充した。フアージラムダ L47.1およびP2宿原性大腸菌 K12株 Q364

はビー・ファン・デル・エルセン博士(アムステルダム大学、オランダ)から入手し、上述通り増殖させた(ローネンおよびブラマー、1980)。

大腸菌 K12 株 BHB 2600、BHB 2688 および BHB 2690 (ホーン、1979) はエム・ファン・モンタグ博士(ゲント大学、ベルギー)から入手したが、大腸菌 K12 株 JM101、7118 および M13 誘導 M13 mp8, 9, 18 および 19 はベセスダ・リサーチ・ラボラトリーズ社(ゲイサズバーグ、メリーランド、米国)から入手した。

#### b) 酵 素

使用したすべての酵素はアマーシャム・インタナショナル社、英国から入手したが、 $\alpha$ -ヘリカーゼはファーム・インダストリー、フランスから入手した。酵素培養は製造者の指示通りに行なった。ATP:RNA アデニルトランスフェラーゼはイーデン等(1982)の記述通りに精製した。

#### c) 他 の 材 料

[ $^{35}\text{S}$ ]メチオニン、[ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP、[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]

ATP:RNA アデニルトランスフェラーゼおよび[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP でその 3'-末端をラベルし、ついで 7 M 尿素含有 2.5% ポリアクリルアミドゲルで分別した(イーデン等、1982)。特異的 mRNA フラクシオンの分取単離については、40  $\mu\text{g}$  ポリアデニール化 RNA をラベルしたポリアデニール化 RNA 4  $\mu\text{g}$  と混合し、変性ポリアクリルアミドゲルで分別した。放射性 2.4 kb RNA クラスをゲルスライスから分離し、ついで 20°C SW 60 ローターを使つてベックマン遠心分離機にて 24,000 rev/分で 15 時間、100 mM NaCl、10 mM トリス-HCl pH 7.5、1 mM EDTA および 0.1% SDS にて 5-30% グリセロール勾配で遠心分離して不純物を除いた。放射性フラクションを集め、エタノールで沈澱させた。ポリアデニール化 RNA はプリカーサーとして [ $^{35}\text{S}$ ]メチオニンを使い、ペルハムとジャクソン(1976)により、ウサギ網赤血球リセート中試験管内にて翻訳させた。翻訳産物はパレリオ等(1983)に記述された MOX 抗血清で免疫沈降させた。

dNTPs、[ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP および [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP はアマーシャム・インタナショナル社、英国から入手した。

ニトロベンジルオキシ-メチル (NBM) 紙はシユライアーおよびシユールから入手し、製造者の指示通りジフゾ形 (DBM) に転換した。

ニトロセルロースフィルター (HATF 型) はミリポアから入手した。

#### RNA 単離、分画化および分析

H. ポリモーファはメタノール又はエタノールの存在下中間対数段階まで生育させた。この細胞は、10 mM トリス-HCl pH 8、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1% NaCl、6% パラ-アミノサリチル酸、1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および 5% フェノール含有バッファーにて、16,000 psi のフレントプレスで繰り返えし加圧して破砕した。ポリアデニール化 RNA の精製は上述通り(イーデン等、1982)、続いて行なった。1 g 細胞から 4  $\mu\text{g}$  の全 RNA と 0.1  $\mu\text{g}$  ポリアデニール化 RNA を得た。全 RNA 又はポリアデニール化 RNA の 4  $\mu\text{g}$  試料は

#### cDNA 合成

ポリアクリルアミドゲルから単離した RNA フラクシオン<sup>1</sup>/<sub>5</sub> は逆転写酵素で放射性 cDNA を得るために使用した(イーデン等、1982)。高放射活性 (3,000 Ci/mM 以上) の [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP および [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dCTP を使つて、高分子量 cDNA 20000 cpm をヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビターの存在下 42°C で 1 時間生成させた。

#### DNA 単離

10 g の H. ポリモーファ細胞を 1 M ソルビトールで洗い、100 ml 1.2 M ソルビトール、10 mM EDTA、および 100 mM クエン酸 pH 5.8 にて再懸濁させ、それに 100  $\mu\text{l}$   $\beta$ -メルカプトエタノールを加えた。細胞を 500  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -ヘリカーゼで 30°C/1 時間培養してスフエロプラスト化した。スフエロプラストはソルベール 65A ローターにて 4,000 rev/分で遠心分離して集め、40 ml 20 mM トリス-HCl pH 8、50 mM EDTA に再懸濁させ、2.5% SDS を加えて分解した。不

完全に分解した細胞はソルパール SS 34 ローターにて 20,000 rev/分 で 30 分間ペレット化し、そして DNA は 60 Ti ローターを使つてベックマン遠心機中 35,000 rev/分 で 48 時間 CsCl-臭化エチジウム密度勾配を使つて遠心分離して粘稠な上澄液から単離した。2  $\mu$ g の DNA は平均長さ 30 Kb で単離した。

#### フアージラムダ L 47.1 におけるクローンバンクの調製

150  $\mu$ g B. ホリモーフ DNA を部分的に Sau 3 AI で消化し、SW 25 ローター中 23,000 rev/分 で 22 時間 1 M NaCl、20 mM トリス-HCl pH 8 および 5 mM EDTA にて 10 - 40 濃度勾配で沈降させた。勾配物を分画化し、フラクション試料は TBE パツプアー (89 mM トリス、89 mM ホウ酸、2.5 mM EDTA) 中 0.6 % アガロースゲルで分別した。

5 - 20 Kb の DNA を含むフラクションを集め、DNA はエタノールで沈降させた。フアージラムダ L 47.1 を生育し、その DNA はリーデポアー等

除いた。MOX 含有タン白質フラクションは  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沈降により単離した (40 - 60 % 飽和)。沈降物を透析後、MOX はイオン交換クロマトグラフィ (DEAE-セファロース) およびゲル濾過 (セファクリン S-400) によりカタラーゼその他のタン白質から分別した。MOX に対する抗体は完全および不完全フロインドアジュバント (デイブユ、米国) を使う常法によりウサギにて生成させた。過酸で処理したアルコールオキシダーゼの配列分析はベックマンのシータエネーターで行なつた。残渣の同定は HPLC で行なつた。アミノ酸組成は標準法を使い、ニンヒドリンで染色させて、クロマスベックアナライザー (ラング、ヒルガー、英国) で測定した。カルボキシ末端アミノ酸はアンブラー (1972) の記述により測定した。

#### デオキシオリゴヌクレオチドの化学合成

デオキシオリゴヌクレオチドはホスファイト技術 (マツチユシとカルーサズ、1981) を使つて、パイオサーチ SAMI ジーンマシーンで合成し

(1984) の記述により単離した。その DNA を BamHI で消化し、アームはマニアティス等 (1982) の記述により酢酸カリウム勾配で遠心分離して単離した。こうして得られた 2  $\mu$ g フアージラムダ DNA アームと 0.5  $\mu$ g Sau 3 AI 消化 H. ホリモーフ DNA を連結し、ホーン (1979) のプロトコルを使つて試験管内でパッケージした。フアージは 14 cm ペトリ皿当たり 20,000 pfu のプラーク密度まで大腸菌株 Q364 にプレートした。プラークはニトロセルロースフィルター (ベントンとデイビス、1977) にプロットし、そのプロットは上記のように単離した放射性 cDNA プローブとハイブリッドさせた。ハイブリッド条件はリーデポアー等 (1984) に記載と同じであり、ハイブリッドするプラークはオートラジオグラフィにより検出した。

#### アルコールオキシダーゼ (MOX) の単離および部分的アミノ酸配列の分析

ノタノールで生育させた H. ホリモーフ細胞を超音波により分解し、細胞片は遠心分離により

た。それを TBE 中 1.6 % 又は 2.0 % ポリアクリルアミドゲルで精製した。

#### デオキシオリゴヌクレオチドプローブとのハイブリッド

デオキシオリゴヌクレオチドを T<sub>4</sub>-ポリヌクレオチドキナーゼおよび [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP でラベルした。得られた MOX クローンの DNA は各種制限酵素で消化し、1 % アガロースゲルで分別し、DBM 紙にプロットした。ハイブリッド化はウオレス等 (1981) の記述により行なつた。

#### DNA 配列分析

完全 MOX 遺伝子を含むクローン 4 (例 1 参照) から、いくつかのサブクローンを標準技術により、フアージ M 13 mp-8、-9 又は M 13 mp-18、-19 誘導物にて作つた。2つのオリエンテーションでクローンした小さいサブクローン (0.5 Kb 未満) は両側から直接シーケンシングした。2つのオリエンテーションでクローンした大きなサブクローンから、エクソヌクレアーゼ Bal 31 消化法 (第 1 図参照) により配列データを得た。



両クローン化オリエンテーションの各々について、RPM 13 DNA は、望ましくはインサートの中心でのみ分解する制限酵素で消化する。続いて、クローンの両オリエンテーションをこのユニークな部位で切断し、各種時間間隔でエクソヌクレアーゼ *Bal* 31 で消化した。約 100 - 150ヌクレオチドが各間隔で除かれるように、培養時間と条件を選んだ。ついで、配列反応が M13 誘導物にてプライムする位置近くにある制限部位を認識する制限酵素で各フラクションを消化した。T<sub>4</sub>-ポリメラーゼおよびすべての dNTP で培養して平末端とし、全ミックスを希釈条件下で連結して、内部 RP 分子の形成させる。全連結ミックスは大腸菌株 JM 101 - 7118 に形質転換させるのに使った。各時間間隔から、いくつかのプラークを拾い出し、サンガーのシーケンスプロトコール（ビギン等、1983）の最近記述された変法を使って配列決定した。

#### 栄養要求変異体の単離

LEU - 1 ( CBS 7171 ) は  $\beta$ -イソプロピル

YNB プレートで培養した（ボーク等、1984）。通常  $10^6$  細胞を単一プレートで培養した。培養3日後に耐性コロニーを取り出し、レプリカを YNB プレートで2度培養して栄養要求株を樹立させた。栄養要求変異株から、*ura*<sup>-</sup>細胞を単離した。別法として、 $1.5 \times 10^6$  酵母細胞は、200  $\mu$ g ウラシルと 0.8 mg 5-フロロオロチン酸を補給した YNB 液体培地 1 ml にて培養させた。2日間の培養後、処理細胞をウラシル含有 YNB で平板培養し、レプリカは2度 YNB で平板培養し、上記の通り分析した。このような耐性変異株はサツカロミセス・ヤレビシエの URA 3 又は URA 5 座に影響を与えたウラシル要求株であることが分った（エフ・ラクルト、私信）。試験した H. ポリモーファの約 600 耐性コロニーの内、52 がウラシル表現型を示した。S. セレビシエの URA 3 と URA 5 変異はオロチジン 5'-デカルボキシラーゼとオロチジン 5'-リン酸塩ピロホスホリラーゼをそれぞれ欠く（ジョーンズとフィンク、1982）から、H. ポリモーファの生成ウラシル栄養要求株は両方の酵

マレートデヒドロゲナーゼ活性を欠く H. ポリモーファ株 NCYC 495 の栄養要求体である。この変異株の単離はグリーソン等（1984）により記載された。

LR 9 ( CBS 7172 ) はオロチジン 5'-デカルボキシラーゼ活性を欠く、H. ポリモーファ ATCC 34438 の栄養要求株である。

単離のために、この酵母の最適生育温度である 37°C の代わりに、30°C で全操作を行なった。酵母細胞は 3 mg エチルメタンスルホネートで2時間突然変異させた（フィンク、1970）。反応は 6 mg チオ硫酸ナトリウム（最終濃度）で止め、溶液を更に10分培養した。突然変異細胞を一度 H<sub>2</sub>O で洗い、分離のためにウラシルを補給した YEPD 又は YNB で2日培養し、ウラシル-栄養要求体を増やし、ついで無炭源のない MM で15時間培養を行なった。最後に、10  $\mu$ g 抗生物質ノルの濃度を含む MM にて12時間ナイスタチン強化を行なった。処理した細胞は200  $\mu$ g ウラシルノルおよび0.8 mg 5-フロロオロチン酸を含む

素活性について調べた（リーベルマン等、1955）。2つの酵素のいずれかに影響を与えた変異株が見つかった（表I）。それらをそれぞれ *h Odc1* と *Opp1* 変異株と名付けた。*Odc1* 変異株は低複製頻度を示し（表II）、個体により形質転換の目的のために適している。

#### H. ポリモーファ由来の自性複製配列 (HARS) の単離

H. ポリモーファ由来の染色体 DNA を *Sal* I 又は *Bam* HI で一部消化し、組みこみプラスミド YIp 5 の単一 *Sal* I と *Bam* HI 部位にそれぞれ連結させた。大腸菌 490 をアンピシリン耐性に形質転換するために、この連結混合物を使用した。YIp 5 は選択マーカーとして URA 3 遺伝子を含む組みこみプラスミドである（スタンチコム等、1980）。

H. ポリモーファ *Sal* I クローンのプラスミドプールは H. ポリモーファ 変異株 LR 9 を形質転換するのに使用した。全体に27の形質転換体を得、 $\beta$ -ラクタマーゼ試験で陽性であった。これ

らのすべてから、大腸菌 490 を酵母ミニセー  
トと共に形質転換後プラスミドを回収した。ナ  
ラスミドの制限分析によれば、殆どどのインサ  
ートは同じパターンを示した。それぞれ 0.4 と 0.6 kb  
のインサートを含む、2つの異なるプラスミド、  
pHARS 1 と pHARS 2 は更に研究用に使用した（第  
2 図）。ポリエチレングリコールで処理した完全  
の細胞の形質転換操作を使って、DNA 1  $\mu$ g 当り  
約 500 - 1,500 の形質転換体の頻度で、両ナ  
ラスミドは H. ポリモーファ変異株 LB 9 を形質転  
換させる。大腸菌プラスミド処方物から回収した  
pHARS 1 と pHARS 2 で再形質転換後 H. ポリモー  
ファ形質転換体のサザン分析は予期したプラス  
ミドバンドを示し、ウラシルプロトコフの原因  
として、URA 3 遺伝子の組みこみを排除する。し  
たがって、ARS 1 様 HARS 配列（スタンチコム  
等、1982）は H. ポリモーファの自律的複製  
を行なうと結論する。HARS 1 も HARS 2 も S. セ  
レビスエでは自律的複製はできなかつた。HARS 1  
は第 3 図に示すように、完全に配列を決定された。

ビスエのコピー数と実質的に同じであるが、ナ  
ラスミド pHAR - 1 と pHARS - 2 は S. セレビスエの  
pBR 58 のように細胞当り約 30 - 40 のコピー  
範囲であるコピー数を示す。このことは HARS 配  
列の自律的に複製する性質を再度証明するもので  
ある。

#### 形質転換操作

いくつかのプロトコルを使用した。

##### a) H. ポリモーファ株 LEU - 1 はベグズ

（1978）の方法を使って形質転換させた。  
菌株は微しく空気をおくり乍ら 37°C、0.5  
の OD<sub>600</sub> まで 500 ml YEPD 液体培地に生育さ  
せた。細胞を採り、20 ml 蒸留水で洗い、20 ml  
の 1.2 M ソルビトール、25 mM EDTA pH 8.0、  
150 mM DTT に再懸濁させ、室温で 15 分培  
養した。細胞を遠心分離により集め、20 ml  
1.2 M ソルビトール、0.01 M EDTA、0.1 M  
クエン酸ナトリウム pH 5.8 および 2% v/v  $\beta$ -  
グルクロンダーゼ溶液（シグマ 1500000  
ユニット/ml）にとり、37°C で 105 分培養

#### H. ポリモーファにおけるプラスミドコピー数の 評価

ARS 配列又は HARS 配列により H. ポリモーファ  
に自律的複製を与えるプラスミドのコピー数はサ  
ザンプロット分析により評価した（第 4 図）。比  
較のために、5 - 10 個のコピー数/細胞（スト  
ルール等、1979）を有する S. セレビスエの  
プラスミド YRP 17（第 4 図、レーン 6、7）  
および細胞当り約 30 - 50 のコピーを有する  
S. セレビスエの高コピー数プラスミド pRB 58  
（第 4 図、レーン 4、5）を使った。YRP 17  
は URA 3 - 含有酵母プラスミドであり、ARS 配列  
（スタンチコム等、1982）を有するが、  
pRB 58 は URA 3 遺伝子を含む 2  $\mu$ m 誘導体  
である（カーソンとボトスタイン、1982）。  
pBR pBR 322 の 2つの組みこみコピーを有する  
クルイペロミセス・ラクテス形質転換体はコント  
ロールとして使用した（第 4 図、レーン 2、3）。  
オートラジオグラムの染色度が示すところでは、  
H. ポリモーファのプラスミド YRP 17 は S. セレ

した。1 時間後、 $\beta$ -グルクロンダーゼの最終  
濃度を 4% v/v にした。形質転換のために、ナ  
ロトプラスト 3 ml を 7 ml の氷冷 1.2 M ソルビ  
トール、10 mM トリス - HCl pH 7 に添加した。  
ナロトプラストを 2000 rpm で 5 分間遠心分  
離により採取し、氷冷ソルビトールバッファ  
で 3 度洗った。洗った細胞を氷上 0.2 ml 1.2 M  
ソルビトール、10 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM トリス  
- HCl pH 7 に再懸濁させた。2  $\mu$ g の YEP 13  
DNA - S. セレビスエの LEU 2 遺伝子および 2  
ミクロン - Ori（プローチ等、1979）から  
成る自律的複製 S. セレビスエプラスミドを  
細胞 100 ml に加え、室温で培養した。20%  
PEG 400、10 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM トリス -  
塩酸 pH 7.5 の溶液 0.5 ml を加え、全体の混合物  
を室温で 2 分間培養した。細胞を短時間（5 秒）  
遠心分離で高速度にセントした MSO マイクロフ  
エーゼに集め、0.1 ml YEPD 1.2 M ソルビト  
ール pH 7.0 に再懸濁させ、室温で 15 分培養した。  
細胞は、2% デイブコ寒天、2% グルコース、

0.67% デイブコ酵母窒素塩基および L- アデニンヘミサルフェート、メチオニン、ウラシル、ヒスチジン、トリプトファン、リジンおよび 1.2 M ソルビトールの各々を 20 mg/ℓ 含有するプレートに拡げて表面に直接培養した。Leu<sup>+</sup> 形質転換体は 37℃ で 5 日培養した後、50 コロニー/μg DNA の頻度で生じたが、DNA を添加しない場合は形質転換体は生じない。

b) 別法として、H. ポリモーファ LEU-1 をタス等 (1984) の方法を使つて、YEP 13 で形質転換させた。指紋的に生育する細胞を 0.4 の OD<sub>600</sub> まで生育させ、TE バッファー (50 mM トリス-HCl pH 8.0、1 mM EDTA) にて洗い、20 ml TE バッファーに再懸濁させた。0.5 ml 細胞を 30℃ で 1 時間 0.5 ml 0.2 M LiCl で培養した。これらの細胞 100 ml に、20 ml TE バッファー中 4 μg YEP 13 を加え、その試料を更に 30 分間 30℃ で培養した。等容量の 70% v/v PEG 4000 を加え、混合物を 30℃ で 1 時間培養し、続いて 42℃ で 5 分間培養した。

ベクターの自律的複製による H. ポリモーファの形質転換には 2 つの特長がある：(1) ウラシル + 表現型の不安定性。形質転換体を YEPD で 10 世代生育させた後、99% 以上が選択培地で生育する能力を失なつた (表 I)。(2) 自律的複製は大腸菌を酵母ミニリセートで形質転換しかつ H. ポリモーファの再形質転換により更に確かめられた。続くサザン分析により、期待したプラスミドの存在を示した。

H. ポリモーファ LR 9 は pRB 58 で又は pBH 85 で形質転換することができず、全 2 ミクロン環状 DNA (ホレンバーク、1982) をプラスミド YIP 5 のアンピシリン遺伝子の Pst I 部位に挿入して構築される。HARS 1 又は HARS 2 の DNA 配列を含む YIP 5 はクレベのプロトコールを使つて、DNA μg 当り 500 - 1500 の形質転換体の頻度で H. ポリモーファ LR 9 に移した。したがつて、形質転換頻度は、B. セレピシエの YRP 1.7 における異種構造 ARS 1 を使う、上記よりも 2 - 5 倍高い。同様に、形質転換体中の HARS プラスミド

1 ml の水を加えた後、細胞を上記 a) のように短時間遠心分離で集め、2 度水で洗い、0.1 ml YEPD 1.2 M ソルビトールに再懸濁させ、室温で 15 分培養した。細胞は上記の通り平板培養した。Leu<sup>+</sup> 形質転換体は 30/μg DNA の頻度で生じる。

c) H. ポリモーファ URA 変異株 LR 9 は選択マーカーとして S. セレピシエの URA 3 遺伝子および S. セレピシエの自律的複製配列 (ARS) を含むプラスミド、YRP 1.7 で形質転換させた (ステイチコーン等、1982)。ベツグズ (1978) のプロトプラスト方法を使つて、2 - 5 形質転換体/μg DNA を得た。イトー等 (1983) の LiSO<sub>4</sub> を使つて、この数を 15 - 20 形質転換体/μg DNA まで上げた。しかし、最良の方法は、PEG 4000 で処理した完全細胞を使う、クレベ等 (1983) の方法であつた。300 までの形質転換体が DNA μg 当り得られた。LiSO<sub>4</sub> 法ならびにクレベ法は 37℃ で行なつた。

の安定性は ARS 1 プラスミドより僅かに高い (表 I)。

#### B. セレピシエ由来の URA 3 遺伝子を組みこむことによる H. ポリモーファの形質転換

S. セレピシエの URA 3 遺伝子は、H. ポリモーファの染色体 DNA に対しニック翻訳した YIp 5 プラスミド DNA のサザンハイブリッドにより示されるように、H. ポリモーファの ODC 遺伝子に対し類似性を示さない。したがつて、H. ポリモーファゲノムのランダム部位への URA 3 遺伝子の低頻度組み込みを予期しなければならなかつた。変異体 LR 9 を組みこみベクター YIp 5 で形質転換すると、ポリエチレングリコール法を使う YNB プレートでは 30 - 40 コロニー/μg DNA となつたが、B. セレピシエ変異体 YNN 27 の形質転換のために YIp 5 を使う対照実験では形質転換体は得られなかつた。38 個の形質転換体の分析では、非選択的培地で生育させた後、4 つの安定な組み込み体を示した。組みこみについては更にサザン分析 (第 5 図) により証明した。

URA 3 遺伝子を H. ポリモーファの染色体 DNA に組みこむ第 2 の操作は、プラスミド pHARS 1 を有する形質転換体から安定な Ura<sup>+</sup> 形質転換体を増やして行なつた。形質転換体は  $10^6$  細胞密度まで液体 YEPD 中で生育させた。  $5 \times 10^6$  細胞を含む試料を使つて、新しい培地  $100 \text{ ml}$  に接種し、そして  $10^6$  の細胞密度まで生育させた。約  $100$  世代になるまでこの操作を繰り返した。変異株 LR 9 の復帰率 (reversion rate) は  $2 \times 10^{-9}$  でありかつ  $10$  世代当りのプラスミドロス頻度は pHARS 1 形質転換体で  $97\%$  であるから、 $100$  世代後の Ura<sup>+</sup> 細胞の大部分は組みこみ体であるべきである。試験した Ura<sup>+</sup> コロニーは、URA 3 遺伝子の組みこみを示す安定な Ura<sup>+</sup> 表現型を維持することを示した。このことは更にサザンブロット分析により確認された。更に、組みこみ頻度は  $5 \times 10^{-9}$  であることをこれらのデータは示している。

ロアとブローベル、1983) と DHAS (ビストリック等、1981) である。  $250 \sim 300$  アミノ酸範囲における活性化酵素は多分ホルムアルデヒドと蟻酸デヒドロゲナーゼ (シュツテ等、1976) である。ポリアデニール化 RNA は網赤血球細胞のない翻訳系における試験管内翻訳により更に特徴づけられた。  $2 \mu\text{l}$  のポリアデニール化 RNA 指向タン白混合物を  $10\%$  SDS ポリアクリルアミドゲルで直接分別し、一方残りの  $18 \mu\text{l}$  は MOX に対する抗血清で免疫沈降させた (第 7 図)。夫々  $78 \text{ Kd}$ 、 $74 \text{ Kd}$ 、 $58 \text{ Kd}$ 、 $42 \text{ Kd}$ 、 $39 \text{ Kd}$  および  $36 \text{ Kd}$  の分子量を有する 6 つの強いバンドが全体のタン白混合物で優位を占めている。本質的に、同一分子量はメタノール生育 M、ポリモーファ細胞由来の全体の細胞抽出物において、ロアとブローベル (1983) により見出された。

$74 \text{ Kd}$  タン白質は取敢えず MOX のモノマーに、 $58 \text{ Kd}$  タン白質はカタラーゼのモノマーに、そして  $39 \text{ Kd}$  と  $36 \text{ Kd}$  のタン白質は夫々ホルムア

## 例 1

ハンセヌラ、ポリモーファ由来のアルコールオキシダーゼ (MOX) の遺伝子のクローニング

### ポリアデニール化 RNA の特性

メタノールで生育させた細胞から単離した、全体の RNA とポリアデニール化 RNA はその 3'-末端で、ATP : RNA アデニルトランスフェラーゼでラベルし、変性ポリアクリルアミドゲルで分別した (第 6 図)。rRNA は別にして、2 群の RNA はそれぞれ長さ  $1 \text{ Kb}$  と  $2.3 \text{ Kb}$  で、ポリアデニール化 RNA レーンにみられる。これらの RNA 群はエタノール生育細胞のポリアデニール化 RNA にみられない (結果は示してない) から、メタノールで生育させて活性化した遺伝子の転写であることは明らかである。  $2.3 \text{ Kb}$  群は非翻訳配列の長さにより、 $700$  から  $800$  のアミノ酸のタン白質をコードしうる。同様に、 $1 \text{ Kb}$  群は  $250 \sim 300$  アミノ酸のタン白質をコードする。メタノールで生育させて活性化されかつ  $700 \sim 800$  のアミノ酸鎖を有する酵素は大概 MOX (カトー等、1976;

ルデヒドデヒドロゲナーゼと蟻酸デヒドロゲナーゼのモノマーに当てることができる。  $78 \text{ Kd}$  ポリペプチドは多分 DHAS であり、 $42 \text{ Kd}$  ポリペプチドは未同定のまゝである。免疫-沈降後、両方の高分子量タン白質は MOX 抗血清と反応する。

### MOX 遺伝子のクローニング

メタノールで生育させて誘導した  $2.3 \text{ Kb}$  mRNA 群は明かに少なくとも 2 つのポリペプチドをコードするが、ハイブリッド化による H. ポリモーファクローンバンクをスクリーニングするのに良好な候補と思えた。部分的に San3AI 消化 H. ポリモーファ DNA の  $5 \sim 20 \text{ Kb}$  フラクシオンはフアージラムダ L 47.1 でクローンした。

インサート DNA  $19$  当たり、 $300,000$  プラークが得られたが、背景は  $1 : 1000$  未満であつた。約  $20,000$  のプラークを含む 2 つのペントンディピスブロットは mRNA 誘導 cDNA プローブの  $15,000 \text{ cpm}$  とハイブリッドした。オートラジオグラフ 3 週間後、約  $40 \sim 50$  のハイブリッド性プラークが検出できた。すべてのプラークを取

り出し、5つを低密度で平板培養しそしてcDNAプローブで第2のハイブリッド化により精製した。4つから、単一ハイブリッドプラーク(1, 3, 4, 5) DNAを単離した。インサートの長さは8~13 Kbであつた。

#### 有機合成 DNA プローブを使うハイブリッド選択

精製 MOX のアミノ末端の30アミノ酸の配列を測定した(第8図)。8. セレピシエの最も豊富なコドンを使つて、14塩基の配列をこのタン白配列の部分から誘導できた。不明確は唯一つである。第4図に示した両プローブを合成した。両プローブには、EcoRI 部位が存在する。DBMプロットは制限酵素 BanHI、EcoRI / HindIII、MindIII / Sali および PstI / Sali で消化した MOX クローンの DNA から作り、1.5 % アガロースゲルで分別した。このプロットを放射線ラベルしたプローブの混合物とハイブリッドした後、クローン1、4 および5はハイブリッドしたが、クローン3はしなかつた。第9図の HindIII / Sali プロットに示す。しかし、このプローブはこれらのクローンの

に示すように、2つのオリエンテーションで夫々 M 13 mp 8 / M 13 mp 9 又は 13 mp 18 / M 13 mp 19 にてサブクローンした。0.5 Kb より小さいクローンは両側から直接シーケンスした。より大きいクローンはクローン化断片の中央に位置するユニークな制限部位で切断し、「材料と方法」に記述したエクソヌクレアーゼ Bal 31 消化サブクローンを生成した。特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使つて、サブクローン化に使う制限部位周囲の配列および明白な配列測定のできない配列は、全配列をカバーする5.5 Kb BamHI / SacI サブクローンを使つて、もう一度シーケンスした。完全なヌクレオチド配列は第11Aと11B図に示す。

この配列は664アミノ酸のタン白質をコードしうる2046ヌクレオチドの開口読み取り枠を含む。開口読み取り枠の最後のコドンはPheをコードし、精製 MOX のカルボキシル末端と一致している。このタン白質をコードする DNA 配列由来のアミノ酸組成および精製 MOX のアミノ酸組成は事実

EcoRI / HindIII 消化 DNA とハイブリッドしなかつた(結果示さず)。EcoRI 部位はプローブに存在するから、クローン中のハイブリッド性 DNA はこの酵素によつても切断されよう。結局、ハイブリッド化オーバーラップは非常に小さくなつたので、安定なハイブリッドを生成しない。

#### 制限地図と配列分析

制限酵素消化物を比較しかつ交差ハイブリッド化実験により、クローン1、4および5は同一の DNA ストレッチをカバーした。

このクローン化 DNA のストレッチの性質を明確に樹立するために、クローン4のインサートを詳細に分析した。アミノ末端プローブとのハイブリッド化によれば、完全 MOX 遺伝子(約2 Kb)が存在し、2 Kb 配列上流と3.5 Kb 下流を含む(第10図)ことを示した。

最小の EcoRI 断片の DNA 配列分析は、アミノ酸配列分析により測定した様に、MOX のアミノ末端に相当するヌクレオチド配列を明らかにした。

配列分析について、いくつかの断片を第10図

上同一である(表Ⅲ)。唯一の重要な差異はセリンとスレオニン残基を含むことであり、それらは周知通り測定するのが難しい。

タン白質の計算分子量は74,050ドルトンであり、MOX の74 Kd の分子量とよく一致する(ポリアクリルアミド/SDSゲルで測定)。

#### コドンの使用頻度

表Ⅳには、MOX のコドン使用頻度が示されている。選択的数のコドンを使う傾向が明らかである。

#### 例 2

プラスミド、pUR 3105 の構築、それにより抗生物質 G 418 に耐性を示すネオマイシンホスホトランスフェラーゼをコードする遺伝子が MOX レギュロンの管理下で染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。

プラスミド YEP 13、YRP 17、pHARS 1 又は pHARS 2 で形質転換した H、ポリモーファ細胞は不安定でかつ非選択的条件下生育10世代後既にその leu<sup>+</sup> 又は ura<sup>+</sup> 表現型を失なつた。安定な形質転換体を得るためかつ MOX プロモーターを試験するために、プラスミド pUR 3105 が構築する

が、ネオマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子 (NEO<sup>R</sup>) は MOX レギュロンの直接管理下になる。NEO<sup>R</sup> 遺伝子の最初の ATG が MOX レギュロンの 1.5 Kb に結合するように、構築される。このような大きなレギュロン断片のクローニングは必要であり、レギュロンの -1000 領域を含まない短い断片は余り有効でないからである。

NEO<sup>R</sup> 遺伝子は、最初の ATG の下流 35 bp から TGA 翻訳停止コドン下流 240 bp までに位置するトランスポゾン Tn 5 由来の 1.1 Kb XmaIII-SalI 断片として単離した。複雑な連結混合物を避けるために、最初の pUR 3101 を構築し (第12A図)、これは MOX レギュロンのほるか上流 SalI-XmaIII (-1510 から -1128) 断片と M13 mp 9 にサブクローンした NEO<sup>R</sup> 遺伝子の融合である。他のプラスミド pUR 3102 が構築され、全 MOX レギュロンを殆んどカバーする MOX 遺伝子の 1.5 Kb SalI-HgiAI 断片は MOX-NEO<sup>R</sup> アダプター (第12B図) 配列に連結されかつ M13 - mp 9 にてクローンされる。このプラス

ミドの 1.2 Kb XmaIII 断片は pUR 3101 の XmaIII 部位にクローンされ、pUR 3103 となり、これは MOX レギュロンと NEO<sup>R</sup> 遺伝子 (第12c図) の正確な融合である。オリエンテーションは HgiAI と SalI の切断によりチェックする。ラムダー MOX - 4 クローンから、SalI-SacI 断片をサブクローンし、構造 MOX 遺伝子 (894 位) の SalI 部位から、構造 MOX 遺伝子 (3259 位) のほるか下流の SacI 部位まで達する (第10図)。この M13 mp 19 サブクローンは pUR 3104 と呼ぶ。プラスミド pUR 3105 は pUR 3103 由来の 2.7 Kb SalI 断片を pUR 3104 の SalI 部位に直接連結して得る。オリエンテーションは SmaI と SacI の切断により試験した。

このプラスミドを HindIII と SacI で切断しかつこの切断プラスミドを H、ポリモーフアに形質転換させた後、G418 耐性コロニーが見つかり、多くの世代の間非選択的条件下で生育させてその耐性を失なわなかつた。

#### 例 3

pUR 3004 の構築、それにより D-アミノ酸オキシダーゼをコードする遺伝子は MOX - レギュロンの管理下 H、ポリモーフアの染色体に移動する。

D-アミノ酸オキシダーゼ (AAO) はメチル栄養性 (methylotrophic) H、ポリモーフアが非常に適している製造のためのオキシドリダクターゼの一例である。MOX 様オキシダーゼである酵素は、メタノール又はメタノールと炭素源としての発酵糖および単一炭素源としての D-アミノ酸の混合物に生育中誘導される酵母のペルオキシソームに転座される。これらの条件下で、細胞は生成する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> から保護される。別法として、AAO が MOX-又は DAS-レギュロンの管理下にある場合、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成することなく、AAO を製造することができる。AAO の製造は培地中メタノールの存在により誘導される。

AAO 酵素のアミノ酸配列は公表され (ロンチ等、1981)、完全な遺伝子はホスファイト技術 (マチュチとカルサーズ、1981) を使つて合成される。この遺伝子は、MOX 遺伝子の配列から

誘導されるように、H、ポリモーフアの最適コドンが使われる様に構築される。更に、いくつかのユニークな制限部位はアミノ酸配列を変えずに導入され、合成中のサブクローン化を容易にする。DNA 配列に第13図に示す。この遺伝子は長さ約 50ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドで合成される。オリゴヌクレオチドは16%ポリアクリルアミドゲルで精製する。サブクローンを生成するオリゴヌクレオチドはリガーゼバッファ (マニアティス等、1982) に一緒に添加され、湯煎中 70℃ に加熱する。湯煎をゆつくり 16℃ に冷却し、T<sub>4</sub>-リガーゼを加える。連結2時間後、DNA を1.5%アガロースゲルで分別し、予期された長さを有する断片をゲルから単離する。断片の末端に位置する各制限部位で切断した M13 mp 18 ベクターにてサブクローンする。この遺伝子を夫々 SalI-HindIII (39-346 位)、HindIII-XmaI (346-589 位) XmaI-KpnI (589-721 位) および KpnI-SalI (721-1044 位) の4サブクローンにてこのように

サブクローンする。SalI-HindIII および HindIII-XmaI サブクローン、および XmaI-KpnI と KpnI-SalI サブクローンを SalI-XmaI 切断 M 1 3 mp 1 8 における 2 つの SalI-XmaI サブクローンと連結する。これらの 2 つのサブクローンを SalI 切断 M 1 3 mp 8 に連結して、pUR 3001 (第 1 3、1 4 A 図) を得る。全配列は改良サンガーデオキシシーケンス技術(ビギン等、1 9 8 3) を使つて、ヌクレオチド配列の測定により確認する。

AAO 遺伝子を含む組込みプラスミドの構築は第 1 4 A、B 図に示す。殆んど完全な AAO 遺伝子は、ユニークな pUR 3104 の SalI 部位(第 1 4 A 図)において、pUR 3001 の AAO 遺伝子-含有 SalI 断片を挿入して、MOX 末端領域の上流において、pUR 3002 を得る。オリエンテーションは HindIII で切断してチェックする。MOX プロモーター領域は pUR 3102 由来の 1.4 Kb SalI-HgiAI 断片(第 1 4 A 図)として単離する。ついでこの断片を、HgiAI-SalI MOX-AAO

レギュロンを除いた。続いて、LEU 2 遺伝子を含む pURS 528-03 の HpaI-SalI 断片を、AAO 構造遺伝子と MOX ターミネーター間にある pUR 3003 の SalI 部位に挿入平滑末端とする。生成プラスミド pUR 3004 のオリエンテーションは SalI と SacI で切断してチェックすることができる。SacI-切断プラスミドを H. ポリモーフ a leu<sup>-</sup>変異体に形質転換した後、pUR 3004 は H. ポリモーフ a の染色体 MOX 遺伝子に組み込む。選択した leu<sup>+</sup> 形質転換体は AAO 遺伝子と共に、染色体 MOX 遺伝子に組み込む。

#### 例 4

pUR 3204、pUR 3205、pUR 3210 および pUR 3211 の構築、それにより小ペプチドホルモン、ヒト成長放出因子を、染色体 MOX 遺伝子(pUR 3203、pUR 3204)に組み込むか、又は HARS1-含有プラスミド(pUR 3205)に組み込むか、又は MOX 構造遺伝子(pUR 3209、pUR 3210 および pUR 3211)に融合して、MOX-レギュロンの管理下発現させる。

アダプターの存在下部分的 SalI-消化 pUR 3002 (第 1 4 A 図)に連結して、pUR 3002 の AAO 遺伝子上流におく。生成したプラスミド pUR 3003 のオリエンテーションは HindIII で切断して再度チェックする。このプラスミドは、SacI で切断しかつ H. ポリモーフ a 細胞に形質転換した後、MOX 遺伝子に組み込む。形質転換体は、インジューサーとしてメタノールの存在下望素源として 0-アミノ酸に生育する能力により選択する。

AAO 遺伝子含有細胞の選択は単純でないので、別の選択マーカーを導入する。結局、S. セレピシエ LEU 2 遺伝子は構造 AAO 遺伝子と MOX ターミネーター間に組み込む。この構築のために、プラスミド pURS 528-03 を使う。このプラスミドはヨーロッパ特許出願第 9 6 9 1 0 号に記載の pURY 528-03 から誘導する。構築は第 1 4 c 図に示す。pURY 528-03 の欠損カルボキシ末端 LEU 2 遺伝子配列は pYeleu 10 由来の完全カルボキシ末端 LEU 2 遺伝子配列(ラトキンとカーボン、1 9 7 7)と置換し、大腸菌 lac-lac

ヒト成長ホルモン放出因子(HGRF)は脳下垂体由来のヒト成長ホルモンの分泌を活性化する、小さい 44 アミノ酸ペプチドである。HGRF は男子の垂体小人症の診断や治療に使用可能である。HGRF は多くの種の成長ホルモン刺激を誘発することが分っているから、動物の成長を刺激しかつミルクの生産を増大することにより、HGRF は獣医方面にも使用できる(クーデ等、1 9 8 4)。ヒト由来の HGRF を得るのは難しいが、遺伝子をクローンしかつ適当な宿主に移すバイオテクノロジーの方法により非常によく製造できた。H. ポリモーフ a によるペプチドホルモンの一般的生産例として、HGRF の遺伝子が H. ポリモーフ a の最適コドンに合成され、いくつかの方法で発現される。

pUR 3204 と pUR 3205 の構築のために、タン白質のカルボキシ末端部分をコードする遺伝子断片は長さ約 50 ヌクレオチドの DNA オリゴマーで合成され、HindIII-SalI 切断 M 1 3 mp 1 8 の HindIII-SalI 断片としてサブクローンし、

pUR 3 2 0 1 (第 1 5、1 6 A 図)を得る。この HindIII-SalI 断片はついで HindIII-SalI 切断 pUR 3 1 0 4 (第 1 6 A 図)の MOX ターミネーター上流に挿入され、pUR 3 2 0 2を得る。MOX プロモーターは、MOX - プロモーターと HGRF 遺伝子 (第 1 5、1 6 A 図)間に HgiAI-HindIII アダプターを使つて、HindIII 切断 pUR 3 2 0 2 に pUR 3 1 0 2 (第 1 6 A 図)由来の SalI-HgiAI MOX - プロモーター断片を挿入して、HGRF 遺伝子の前に挿入する。生成プラスミド pUR 3 2 0 3 のオリエンテーションは SalI と HgiAI で切断してチェックする。SacI 切断プラスミドの形質転換後、pUR 3 2 0 3 は H. ポリモーファの染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。形質転換体は免疫活性について選択する。pUR 3 2 0 3 は SalI で切断して、LEU 2 遺伝子を含む pUR 5 2 8 - 0 3 (第 1 6 B 図)の SalI-HpaI 断片を挿入する。この遺伝子の pUR 3 2 0 4 におけるオリエンテーションは HindIII と EcoRI で切断してチェックする。SacI 切断プラスミド (第 1 6 B 図)を leu<sup>-</sup>H. ポ

リモーファ変異体に形質転換した後、pUR 3 2 0 4 は染色体 H. ポリモーファ MOX 遺伝子に組みこむ。leu<sup>+</sup>形質転換体について選択。H. ポリモーファにて自律的に複製しかつ HGRF 遺伝子を含む pUR 3 2 0 5 と呼ぶプラスミドは、MOX - プロモーターとターミネーター間に挿入した HGRF 遺伝子を含有する、pUR 3 2 0 3 の EcoRI、部分的 HindIII 切断 4 Kb 断片を部分的 HindIII-EcoRI 切断 pHARS 1 (第 2、1 6 C 図)に挿入して得る。pUR 3 2 0 5 の構築は HindIII で切断してチェックする。

微生物により HGRF として小ペプチドの生産は酵素分解 (板倉等、1977)の結果、しばしば不安定である。タン白様 MOX に対する融合、およびその後のペルオキシソームへの移行により分解を防ぐことができた。したがって、MOX 構造遺伝子の 1775 位 (アミノ酸 591、第 10 図、第 11 図)のユニーク KpnI 部位に HGRF 遺伝子を挿入することを決定した。HGRF 遺伝子は長さ 50ヌクレオチドの DNA オリゴマーに再度合成される

が、M 13 mp 19 の完全 HGRF 構造遺伝子としてクローンされる 2 つの KpnI-HindIII サブクローンは KpnI (プラスミド pUR 3 2 0 6、第 17 図、第 16 D 図)で切断した。更に、27 位の HGRF の内部メチオニンをコードする ATG トリプレット (クーデ等、1984) (DNA 配列の 82 位)はシステインをコードする TGT トリプレットに転換される。このことは HGRF 活性を本質的に変えず、CNBr 切断 (板倉等、1977)により融合タン白質由来の HGRF の切断を容易にする。ファージラムダ MOX - 4 (第 10 図)から、SphI (-491 位) - KpnI 断片を単離し、SphI-KpnI 切断 M 13 mp 19 に挿入され、pUR 3 2 0 7 を得る。pUR 3 2 0 6 を KpnI で切断し、HGRF 遺伝子を pUR 3 2 0 7 の KpnI 部位に挿入し、pUR 3 2 0 8 を得る。オリエンテーションは pUR 3 2 0 8 の単一ストランド DNA で直接配列分析によりチェックする。続いて、ユニーク KpnI 部位から SacI 部位まで、MOX 遺伝子の下流部分はファージラムダ MOX-4 由来の 1.5 kb 断片として

単離し、SacI - 部分的 KpnI 切断 pUR 3 2 0 8 に挿入する。生成プラスミド pUR 3 2 0 9 のオリエンテーションは KpnI で消化してチェックする。SacI、SphI 切断プラスミドの形質転換後、pUR 3 2 0 9 は H. ポリモーファの染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。免疫活性に関する選択。

この MOX - HGRF 融合遺伝子は、部分的 HindIII、部分的 EcoRI 切断 pUR 3 2 0 9 由来の全融合遺伝子を単離して pHARS I に、EcoRI 部分的 HindIII 切断 pHARS I に挿入される。この結果が pUR 3 2 1 0 が得られ、形質転換後 H. ポリモーファにて複製する (第 16 E 図)。別法として、pUR 5 2 8 - 0 3 の LEU 2 - 含有 SalI-HpaI 断片を、pUR 3 2 0 9 の部分的 KpnI 切断後、コードしたタン白質のカルボキシ末端にある、HGRF 遺伝子の平滑末端 KpnI 部位に挿入する。生成プラスミド pUR 3 2 1 1 は、SacI、SphI 切断プラスミドの形質転換後 (第 16 F 図)、H. ポリモーファの染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。

考 察



開口読み取り枠の長さから、精製 MOX と DNA 由来タン白配列のアミノ酸組成の類似性から、および同一の 3' 末端アミノ酸から、H. ポリモーフア由来の MOX の完全遺伝子をクローンした。その計算分子量は SDS ポリアクリルアミドゲルで測定した分子量とよく一致する。コード配列とは別に、1200 bp 以上は 5'-と 3'-非コード領域からシーケンスし、コード配列の上流 SalI 部位から SacI 部位下流まで達する。遺伝子は介在配列で妨害されないようである。

タン白質はプリカーサーの形で転写されない。分子量の測定により、N-末端シグナル配列はロアとブローベル(1983)又はロッゲンカンパ等(1984)の初期研究では検出出来なかつた。類似の実験では、ラット肝臓のパーオキシソマル酵素ウリカーゼ(ゴールドマンとブローベル、1978)およびカタラーゼ(ゴールドマンとブローベル、1978;ロビーとラザロウ、1978)は切断可能なN-末端シグナルペプチドを含まないことが示唆された。しかし、これらの著者によ

り論究されている様に、タン白分解的劣化はこのようなシグナル配列の検出の欠如を説明するものである。

本発明者の配列結果がはつきり証明することは、このタン白質をパーオキシソームに転座するため、切断可能なN-末端シグナル配列は必要でない。このような転座シグナルは、オポアルブミンの場合のように(リンガツパ等、1979)、成熟タン白質の内部配列に十分位置しうる。タン白質配列の検査はアミノ酸配列 GlyXGlyYZGly (アミノ酸13-18)を示し、FAD-(フラビンアデニンジヌクレオチド)-含有酵素(ロンチ等、1981)に特長的である。

上記の MOX 遺伝子の単離は MOX をコードする DNA 配列および MOX 酵素のアミノ酸配列の測定方法を示すものである。

同様に、他のオキシダーゼ酵素に属する DNA 配列とアミノ酸配列を単離しかつ測定することができる。MOX 遺伝子配列の知識を利用して、アルコールオキシダーゼをコードする遺伝子又は他のオ

な役割を演じている。

前に記述した様に、MOX と DHAS の合成はグルコールリプレッションに供する。0.5% (v/v) メタノールの代りに基質としてグルコール/メタノール混合物を用いる場合、高レベルの MOX が得られることが分つた。前に条件下では、後者の条件の20%と比較して、30%までの細胞タン白質は MOX から成る。

MOX と DAS のレギュロンには、グルコースによるリプレッション/活性又はメタノールによる誘導の調節に決定的役割を演じる配列が存在せねばならないと考えられた。したがって、ある相関関係が予期される。

双方共配列 CTATAAATA を有する、「TATA-ボックス」の著しい相同性が見出された。MOX と DAS レギュロンの上流に近い領域には他の相同性は見出されなかつた。期待に反して、両レギュロンの詳細な研究は、翻訳開始コドンの約1000 bp 上流領域に MOX と DAS のレギュロンの顕著な相同性を示した。MOX のレギュロンにおいて65 bp

キシダーゼをもコードする遺伝子の単離を容易にする。酵素の性質と構造を比較することにより、構造の働きと活性の関係を多分確立することができる。部位指向突然変異生成として、タン白コード配列の短縮化又は伸長化、相当するポリペプチドを修飾して、改良された性質、例えばアルカリ安定性の増大を有するオキシダーゼ、又は洗剤製品と一層相容性の基質を必要とするオキシダーゼを選択する方法も適用しうる。H. ポリモーフア由来の MOX の構造遺伝子の単離と特性化以外に、H. ポリモーフア由来の DHAS の構造遺伝子の単離と特性化を同じように行なつた。

DAS の DNA 配列は第18A-18C図に示す。制限地図は第19図に示す。DAS の DNA 配列から計算したアミノ酸組成は精製 DHAS の加水分解後に測定したアミノ酸組成と一致している様であつた。DHAS 酵素はホルムアルデヒドとキシルロースモノホスフェートからのジヒドロキシアセトンの合成を触媒する。この反応はメタノール-同化反応(ビーンハイス等、1983)において重要

の實際上完全な連続領域は、いくつかの非同相性領域（第20図）により散在されている、DASレギュロンの139 bp領域に相同している。類似の相同性は両遺伝子の任意の他の領域にみられない。すなわち、その上流と下流の配列を含めて長さ4 Kbにわたつてみられない。これらの相同配列はグルコースやメタノールによる両遺伝子の調節の役割を有することが示唆されている。MOXの構造遺伝子のATGの上流の最初の500 bpをレギュロンとして含有するベクターによる形質転換の研究は次の点を示した。即ち、この短くなつたMOX-レギュロンはインディケーター遺伝子 $\beta$ -ラクタマーゼの比較的低発現をおこした。インディケーター遺伝子は容易にスコアできる性質をもつた酵母を供する遺伝子であり、例えば抗生物質0.418に耐性を示すネオマイシンホスホトランスフェラーゼの遺伝子又はロイシンの如き栄養要求マーカである。

MOXとDAS遺伝子のはるか上流の相同領域が各種妨害を有するという事実、およびDASが0.1グ

および完全な特性化に関する。更に、H. ポリモーフアにおけるMOXやDHASの生合成を調節するDNA配列、特にレギュロンやターミネーターの単離と特性化に関する。

更に、H. ポリモーフアCBS 4732以外のH. ポリモーフア菌株、又はH. ポリモーフア以外のハンセンラ種、又はハンセンラ以外の酵母、又はカビ又はH. ポリモーフアCBS 4732由来のMOX遺伝子の強力なレギュロンおよびターミネーターをもつ高級ユーカリオートから派生するアルコールオキシダーゼその他のオキシダーゼをコードする遺伝子の組み合わせに関する。これらの組み合わせはとりわけH. ポリモーフア又は関連種由来の自律的複製配列又はセントロマーを含むミニクロモソーム、および任意には選択マーカとテロマーを有するベクターにおくことができる。これらの組み合わせはH. ポリモーフアの染色体DNAに組みこむこともできる。

更に、強力なレギュロン又はその一部およびMOXおよび/又はDASのターミネーターおよび部

ルコースで抑制されかつMOXが抑制されないという事実は、これらの相同領域がグルコースによるリプレッション/活性化によつておよび/又はメタノールの存在下発現の誘導によつて重要であることを示唆している。この仮定は実際正しいことが分つた。したがつて、これらの相同領域の有無は特定の用途に重要である。例えば、若しMOX遺伝子の-1052から-987領域又はDAS遺伝子の-1076から-937領域がメタノールによるMOX又はDASの誘導に重要であるならば、これらの領域の存在はMOX又はDASの発現によつておよび/又はメタノールによる他の酵素の誘導によつて重要である。他の例はグルコースによるリプレッションを避けるためにその領域を除くことであり、炭素源としてグルコースを有するMOXおよび/又はDAS調節領域の影響下MOXやDHAS以外のタン白質をコードする遺伝子の発現に必要である。

本発明の一特徴は、H. ポリモーフア由来のMOXおよびDHASをコードする構造遺伝子の単離

位方向突然変異生成又は他の方法により、アルコールオキシダーゼその他のオキシダーゼをコードする変化した構造遺伝子の組み合わせに関する。これらの変化した構造遺伝子はミニクロモソーム中エピソームベクターに組み入れ、又はH. ポリモーフア、H. ウィンゲイ、H. アノマラおよびB. セレピシエその他の酵母の染色体に組みこむことができる。

これ以外に、本発明はオキシダーゼ以外のタン白質をコードする構造遺伝子とH. ポリモーフアのMOXおよび/又はDAS遺伝子のレギュロンおよびターミネーターとの組み合わせに関する。

本発明の非常に重要でかつ望ましい態様は、微生物を適当な条件下で培養して、任意にはポリペプチドを濃縮しそして公知方法で集取する。タン白質又は酵素の如きポリペプチドの製造法において、組み換えDNA技術により得られかつこのポリペプチドをコードする構造遺伝子を含む微生物を使い、プロモーターおよびH. ポリモーフア

CBS 4732のMOX遺伝子の-1052から-987

領域、又はH. ポリモーファ CBB 4 7 3 2 の DAS 遺伝子の -1076 から -937 領域、又は他のメチロトロフ型カビ又は酵母の相当する領域、又はこれらの任意の領域の有効的修飾を含むレギュロンのコントロール下にこの発現を行なう、上記方法である。

見るべきことは、第20図に示されかつこゝに MOX と DAS 遺伝子の -1000 領域として言及されている当該領域は構造遺伝子の発現に非常に重要であるということが本発明により見出された。この領域を除いた MOX レギュロンを含む組み換え体で行なつた実験は低レベルの発現を示した。したがつて、このような -1000 領域又はその有効な修飾（即ちこの領域機能の有意な欠損をおこさない任意の修飾）を含むレギュロンを使うと、比較的高量の目的ポリペプチドを製造することができる。

本発明方法の望ましい態様は、当該構造遺伝子が遺伝子産物を微生物宿主のパーオキシソームすなわち均等のミクロボダイに転座させるのに包含

されるアミノ酸配列をコードする1種以上の DNA 配列を供した点で特徴がある。生成したポリペプチドをパーオキシソームすなわち均等のミクロボダイに転座させると、その安定性を改善し、高収率を得る。ある種のポリペプチド特にオキシダーゼでは、このような転座は微生物宿主の生存のためには肝要である。即ち、微生物宿主細胞がオキシダーゼの基質で生育する場合に生成する過酸化水素の毒性効果から宿主を守ることである。もしこのオキシダーゼが製造法に使用する微生物の宿主において機能的であるアドレスシグナルを含まないならば、宿主特異的アドレスシグナルをコードする配列を有する構造遺伝子を供すべきであつて、例えばこの様な配列を加えるか又はこれらと遺伝子の最初のアドレス配列と置換する。融合パートナーが適切なアドレスシグナルを有する融合ポリペプチドの生産は別の可能性である。メチロトロフ型酵母をこの製造に使う場合には、DNA 配列はパーオキシソーム又はミクロボダイに MOX 転座させる MOX 遺伝子又はその一部から成ること

が望ましい。

最後に、本発明の特徴はH. ポリモーファ由来の MOX を他の酵母において合成することに関する。

アルコールオキシダーゼ産生能を有する若干の微生物を以下に挙げる。

アルコールオキシダーゼを産生する酵母

(リーおよびコマガタによる分類、1980)

グループ 1	カンジダ・ボイジニ
グループ 2 a	ハンセヌラ・フィロデンドラ
	ピチア・リンドネリ
	トルロプシス・ネモデンドラ
	"           ・ピナス
	"           ・ソノレンシス
グループ 2 b	カンジダ・カリオシリグニコラ
	ハンセヌラ・グルコチマ
	"           ・ヘンリチ
	"           ・ミヌタ
	"           ・ノンフェルメンタス
	"           ・ポリモーファ
	"           ・ウィツケルハミ

ピチア・ピナス

"   ・トレハロフィラ

グループ 2 c   カンジタ・サクシフィラ

トルロプシス・ニトラトフィア

グループ 3   ピチア・セロピオサ

グループ 4   ハンセヌラ・カプスラタ

ピチア・パストリス

トルロプシス・モリシアナ

アルコールオキシダーゼを産生するカビ

レンジト・トラベア

ポリボラス・ベルシカラー

"           ・オブツサス

ボリア・コンチグア

アルコールオキシダーゼ以外のオキシダーゼの中で最も興味のあるものは：

- グリセロールオキシダーゼ

- アルデヒドオキシダーゼ

- アミンオキシダーゼ

- アリールアルコールオキシダーゼ

- アミノ酸オキシダーゼ

- グルコースオキシダーゼ
- ガラクトースオキシダーゼ
- ソルボースオキシダーゼ
- 尿酸オキシダーゼ
- クロロパーオキシダーゼ ; および
- キサンチンオキシダーゼ。

H. ポリモーファ由来の MOX および DAS 遺伝子の強力なレギュロンやターミネーターとオキシダーゼの構造遺伝子との組み合わせは、特定の宿主又は宿主群に構造遺伝子を複製できる、例えば H. ポリモーファ由来の配列又はセントロマー（およびテロマー）を、H. ポリモーファおよび関連の酵母又はその他の微生物に移行しうる適切なベクターに自律的複製する。

既述した H. ポリモーファ変異株 LEU-1 と LR 9 は夫々 CBS に 7171 と 7172 の番号で寄託されている。

以下に文献、表、図面を説明する。

表 II

H. ポリモーファのウラシル要求株の形質転換

株	プラスミド	形質転換頻度 <sup>a</sup>	安定性 <sup>b</sup> (%)	形質転換 DNA の状態
LR 9	YRP17	$2.2 \times 10^2$	<1	自律的複製
LR 9	pHAR81	$1.5 \times 10^3$	2	自律的複製
LR 9	pHAR82	$4.6 \times 10^2$	1.5	自律的複製
LR 9	YIP5	3 (38) <sup>c</sup>	105	組みこみ
LR 9	pRB58	0	-	-
LR 9	pHH85	0	-	-
YNN 27	YIP5	0	-	-

a) DNA 1 µg 当りの全数として表わす。ポリエチレングリコールで処理した完全細胞は「材料と方法」で記述したように形質転換用に使用した。

b) 10 世代間 YEPD で生育させた後、残存ウラシル原栄養体率として表わす。

c) ( ) 内の数字は遊離プラスミド YIP5 含有ミニコロニーの数を示す。

表 I

生育にウラシルを必要とする H. ポリモーファ中のオロチジン 5'-リン酸塩デカルボキシラーゼおよびオロチジン 5'-リン酸塩ピロホスホリラーゼの活性

菌株 / 表現型	転換率	活性 (%) <sup>a</sup>	
		オロチジン 5'-リン酸塩デカルボキシラーゼ	オロチジン 5'-リン酸塩ピロホスホリラーゼ
野生型	-	100	100
LR 9/odc1	$<2 \times 10^9$	<1	106
MR 7/odc1	$6 \times 10^7$	<1	71
NM 8/odc1	$3 \times 10^8$	<1	105
CLK 55/opp1	測定せず	90	<1
CLK 68/opp1	"	82	<1
YNN 27/ura3	"	0	

後期対数期まで菌株を YEPD で生育させた。細胞の抽出はブラウンホモジナイザーを使つて、ガラスビーズで行なつた。タン白質は 280 nm で光学密度により評価した。

a) 野生型活性率として表わした。

表 III

MOX のアミノ酸組成

アミノ酸	DNA 配列	加水分解物 <sup>a)</sup>
PHE	31	32
LEU	47	49
ILE	34	34
MET	12	11
VAL	42	43
SER	43	33 a)
PRO	43	42
THR	44	38
ALA	47	50
TYR	27	27
HIS	19	21
GLN	13	
GLU	36	51
ASN	32	
ASP	50	84
LYS	35	38
CYS	13	12
TRP	10	- b)
ARG	36	36
GLY	50	53

a) 加水分解は 24 時間行なつた

b) 測定せず

表 IV

S. セレピシエ、H. ポリモーファおよび大腸菌の望ましい  
コドン使用頻度の比較

サツカロミセス	ハンセスラ MOX	大腸菌
ALA GCU, GCC	GCC	GCC 使用せず 不明
SER UCU, UCC	UCC, UCG	UCU, UCC
THR ACU, ACC	ACC	ACU, ACC
VAL GUU, GUC	GUA 使用せず 不明	GUU, GUA
ILE AUU, AUC	AUC, AUU	AUC
ASP GAC	GAC	GAC
PHE UUC	UUC	UUC
TYR UAC	UAC	UAC
CYS UGU	不明	不明
ASN AAC	AAC	AAC
HIS CAC	CAC	CAC
GLU GAA	GAG	GAA
GLY GGU	GGCは実際 上使用せず 不明	GGU, GGC
GLN CAA	CAG	CAG
LYS AAG	AAG	AAA
PRO CCA	CCU, CCA	CCG
LEU UUG	CUG, CUC	CUG
ARG AGA	AGA	CGU

カデミツク・プレス、ニューヨーク。

6. ロッゲンカンプ・アール、ヤノヴィッツ・ゼ  
ット、スタニコフスキ・ビーおよびホレンバ  
ーグ・シー・ビー (1984)、モレキュラー・  
ジーン・ジェネティクス 194、489-493。
7. サーム、エイチ (1977)、アドバンシズ・  
イン・マイクロバイオロジック・エンジニアリ  
ング、ゴース・テイ・ケイ、フィーヒター・  
エイおよびブレイクプラウ・エヌ著、第6巻、  
77-103、スプリングー・フェルラーグ、  
ベルリン。
8. ビストリツク・エル・ブイ、ソコロフ・エイ・  
ビーおよびトロチエンコ・ワイ・エイ (1981)、  
FEBS レターズ、132、324-328。
9. ロア・エムおよびブローベル・ジイー  
(1983)、プロシーディングス・オブ・ナ  
ショナル・アカデミー・サイエンス、USA、  
80、6872-6876。
10. ビーンハイス・エム、フアン・ディケン・ジ  
エイ・ピー、ピロン、エス・エイ・エフおよび

## 引用例

1. GB-P 81,225,713号 (コルゲート・  
パルモリブ・カンパニー、1971年3月24日  
公告、優先日1968年4月19日)。
2. DE-P 2,557,623号 (ヘンケル & シ  
ー社、1977年6月30日公開、優先日  
1975年12月20日)。
3. GB-P 2,101,167号 (ユニリーバー・  
ビー・エル・シー、1983年1月12日公開、  
優先日1981年7月7日)。
4. フアン・ディケン・ジエイ・ピー、オットー・  
アールおよびハーダー・ダブリュー (1976)、  
アーカイブス・オブ・マイクロバイオロジイ  
111、137-144。
5. ビーンハイス・エム、フアン・ディケン・ジ  
エイ・ピーおよびハーダー・ダブリュー  
(1983)、アドバンシズ・イン・マイクロ  
バイアル・フィジオロジイ、ローズ・エイチ、  
ガレス・モリス・ジエイおよびテンペスト・デ  
イー・ダブリュー著、第24巻、1-82、ア  
ハーダー・ダブリュー (1978)、アーカイ  
ブス・オブ・マイクロバイオロジイ、117、  
1953-163。
11. ローネン・ダブリュー・エイ・エムおよびブラ  
マー、ダブリュー・ジイー (1980)、ジ  
ーン、20、249-259。
12. ホーン・ビー (1979)、メソッズ・イン・  
エンザイモロジイ、ウー・アール著、第68巻、  
299-309、アカデミックス・プレス、ニュー  
ヨーク。
13. イーデンス・エル、ヘスリング・エル、クロ  
ック・エル、リーデボアー・エイ・エム、マー  
ト・ジエイ、トーネン・エム・ワイ、ピッサー・  
ジイーおよびベリツプス・シイー・ティー  
(1982)、ジーン、18、1-12。
14. ペルハム・エイチ・アール・ビーおよびジャ  
クソン・アール・ジエイ (1976)、エアロ  
ー・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー、  
67、247-257。
15. バレリオ・ダイー、ダイペンスタイン・エム・

- ジェイ・シー、メーラ・カン・ピー、ギユーツ・フアン・ケッセル・エイ、ドロールド・エイおよびフアン・デル・エプ・エイ・ジェイ (1983)、ジーン、25、231-240。
16. リーデボアー・エイ・エム、ベリツプス・シー・ティーおよびデツカー・ビー・エム・エム (1984)、ジーン、30、23-32。
17. マニアテイス・ティー、フリッチ・イー・エフおよびサムブルツク・ジェイ (1982)、モレキュラー・クローニング、278頁、コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリー版、ニューヨーク。
18. ペントン・ダブリュー・ディーおよびディビス・アール・ダブリュー (1977)、サイエンス 196、180-182。
19. アンブラー・アール・ピー (1972)、メソツズ・イン・エンザイモロジー、第25巻、262-272、アカデミック・プレス、ニューヨーク。
20. マッチュシ・エム・ディーおよびカルサーズ・エイおよびティバー・シー・ダブリュー著、第17巻、59-78、アカデミック・プレス、ニューヨーク。
25. ボーク・ジェイ・ディー、ラツクラウト・エフおよびフィンク・ジー・ディー (1984)、モレキュラー・ジーン・ジェネティック 197、345-346。
26. ジョーンズ・イー・ダブリューおよびフィンク・ジー・ディー (1982)、コールドスプリング・ハーバー・モノグル・シリーズ、11B、181-299。
27. リーベルマン・アイ、コーンパーグ・エイおよびシムス・イー・エス (1955)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー 215、403-415。
28. ステインクコーム・ディー・ティー、トマス・エム、ケリー・ジェイ、セルカー・イーおよびディビス・アール・ダブリュー (1980)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス、USA 77、4559-4563。
29. ステインクコーム・ディー・ティー、マン・シー、およびディビス・アール・ダブリュー (1982)、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジイ 158、157-179。
30. ストラール・ケイ、ステインクコーム・ディー・ティー、シエラー・エスおよびディビス・アール・ダブリュー (1979)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス、USA 76、1035-1039。
31. カールソン・エムおよびポトスタイン・ディー (1982)、セル 28、145-154。
32. ベツグズ・ジェイ・ディー (1978)、ネイチャー 275、104-109。
33. ブローチ・ジェイ・アール、ストラサーン・ジェイ・エスおよびヒックス・ジェイ・ビー (1979)、ジーン 8、121-133。
34. ダス・エス、ケラーマン・イーおよびホレンバーグ・シー・ビー (1984)、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー 158、1165-

1 1 6 7。

35. イトー・エイチ、フクダ・ワイ、ムラタ・ケイおよびキムラ・エイ(1983)、ジャーナル・オブ・バクテリオロジー 153、163-168。
36. クレーベ・アール・ジェイ、ハリス・ジェイ・ブイ、シャープ・ゼット・ディーおよびダグラス・エム・ジー(1983)、ジーン 25、333-341。
37. ホレンバーグ・シー・ピー(1982)、カレント・トピックス、マイクロバイオロジカル・イムノロジー 96、119-144。
38. カトー・エヌ、オーモリ・ワイ、タニ・ワイおよびオガタ・ケイ(1976)、ユーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー 64、341-350。
39. シュツテ・エイチ、フロスドルフ・ジェイ、サーム・エイチおよびクラ・エム・アール(1976)、ユーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー 62、151-160。
- ジー(1978)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス、USA 75、5066-5070。
45. ロビー・エムおよびラザロー・ピー・ピー(1978)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス USA 75、4344-4348。
46. リンガツパ・ブイ・アール、リンガツパ・ジェイ・アールおよびブローベル・ジー(1979)、ネイチャー 281、117-121。
47. ワトソン・ジェイ・ディー、ツーズ・ジェイおよびフルツ・ディー・ティー(1983)、組換え DNA、短期コース、178頁、フリーマン・アンド・カンパニー発行、ニューヨーク、
48. リー・ジェイ・ディーおよびコマガタ・ケイ(1980)、ジャーナル・オブ・ジエネティック・アプライド・マイクロバイオロジー 26、133-158。

#### 4. 図面の簡単な説明

40. ロンチ・エス、ミンチオティ・エル、ガリアノ・エム、カーティ・ビー、スエンソン・アール・ビー、ウィリアムス・シー・エイチおよびマセイ・ブイ(1981)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー 257、8824-8830。
41. ラトキン・ピーおよびカーボン・ジェイ(1977)、プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミック・サイエンス、USA 74、487-491。
42. クーデ・エフ・エツクス、ジアズ・ジェイ、モアー・エム、ロスカム・ダブリューおよびロンクツチ・アール(1984)、トレンズ・イン・バイオテクノロジー 2、83-88。
43. イタクラ・ケイ、ヒロセ・ディー、クリー・アール、リッグズ・エイ・ディー、ヘインカー・エイチ・エル、ポリパー・エフおよびボイアー・エイチ・ダブリュー(1977)、サイエンス 198、1056-1063。
44. ゴールドマン・ビー・エムおよびブローベル・

第1図 特異的 MOX サブクロンのシーケン化に使用するエクソヌクレアーゼ *Bal 31* 消化方法。M13 mp-8 又は -9、-18 又は -19 にてサブクロンした断片 X-Y をユニークな制限 Z 部位で切断する。DNA 分子は時間依存性エクソヌクレアーゼ *Bal 31* 消化に供する。M13 シーケンスプライマー近くに位置する DNA 断片は制限酵素 Y を使つて除く。末端は T<sub>4</sub>-DNA ポリメラーゼで培養して平滑末端とし、ついで分子内的に連結させる。ファージプラークを形質転換後取り上げ、断片を X 部位の方向で Z 部位からシーケンスする。逆転複数クロニング部位を有する M13 誘導体を使つて、断片を X 部位の方向に Z 部位からシーケンスする。

第2図 HARS 断片を Y1 p5 の単一 *SalI* 部位に挿入して誘導した pHARS プラスミドの整列。

第3図 HARS-1断片の完全ヌクレオチド配列。

第4図 H. ポリモーファ形質転換体のサザンハイブリッドによるコピー数の評価。各プローブ8および18μlの試料を電気泳動にかけた。レーン1はHindIIIとEcoRIで消化したファージラムダDNAである。レーン2, 3はHindIII(エム・レイネン、ケイ・プロイニツロおよびシー・ピー・ホレンバーグ、未公表)で消化した組み込みプラスミドの2つのコピーを含むE. ラクティスの形質転換体である。レーン4-7はEcoRIで消化したpRB(4-5)とYRP17(6-7)でそれぞれ形質転換させたYNN27; レーン8, 9はEcoRIで消化したYRP17で形質転換させたLR9; レーン10, 11はHindIIIで消化したpHARS2で形質転換したLR9; レーン12, 13はEcoRIで消化したpHARS1で形質転換したLR9である。

ゲルについて行なつた。酵母rRNAの位置およびそれぞれの分子量は18Sと25Sにより示されている。レーンBに見られる2.3 kbバンドはcDNAプローブに転換し、ついでH. ポリモーファクローンバンクからMOXとDHASを単離するのに使つた。

第7図 メタノール活性他H. ポリモーファmRNAをウサギ網赤血球リセートで試験管内翻訳した後に得た<sup>35</sup>S-ラベルしたタン白質。全リセート(レーンA)2μl又はMOX特異的抗血性(レーンB)を使う残存18μlの免疫沈降物を11.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルで分別した。公知の分子量を有するタン白混合物はマーカーとして使用した。

第8図 ベックマン シーケネーターで測定した、精製MOXのN-末端配列。サツカロミセス所望コドンを使つて、配列Pro-Asp-Gln-Phe-Aspから誘導しうる2つのプロ

第5図 プラスミドYIp5の組み込みにより形質転換されたH. ポリモーファ変異株LR9由来のDNAのサザンプロットのオートラジオグラム。レーン1はHindIIIとEcoRI双方で消化したファージラムダDNA; レーン2は未消化のpHARS-1; レーン3, 5および6, 7は2つの異なる形質転換体由来のDNAを示す。レーン3は未消化; レーン4はEcoRIで消化; レーン5はPvuIIで消化; レーン6はEcoRIで消化; レーン7はPvuIIで消化; レーン8はEcoRIで消化; レーン8はEcoRIで消化したプラスミドYIp5。ニック翻訳したYIp5はハイブリッドプローブとして使用した。

第6図 オリゴ(αT)セルロースについて一度精製(レーンA)又は二度精製(レーンB)した、H. ポリモーファ由来の<sup>32</sup>P-ラベルしたRNAの電気泳動。電気泳動は変性7M尿素2.5%ポリアクリルアミド

ープ。

第9図 HindIII / Sall 切断MOXクローンのDBMプロットのハイブリッド化。このDNAを1.5%アガロースゲル(第9A図)で分別し、プロットをMOX-由来合成DNAプローブ混合物にハイブリッドした(第8図)。クローン1, 4および5の唯一のバンドは、第9A図の矢印に示すように、ハイブリッドする(第9B図)。レーンM: 分子量マーカー、レーンA, B, CおよびD: 夫々クローン1, 3, 4および5。レーンE: ラムダL47.1。

第10図 MOXクローン4の制限地図。MOX遺伝子のサブクローン化およびシーケンス化に使用した適当な制限部位のみを示してある。構造MOX配列および作つたM13サブクローンを含む開口読み取り枠を表わす。使用した制限部位: B = BamHI, E<sub>I</sub> = EcoRI, E<sub>V</sub> = EcoRV, P = PstI, S1 = Sall, Sc = SacI,



St = StuI、H = HindIII、Sp = SphI、  
K = KpnI、Hg = HgiAI および X = XmaI。

第11A、B図 MOX 構造遺伝子のヌクレオチド配列およびその5'ーおよび3'ーフランキンゲン配列。

第12A、C図 ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝がH. ポリモーファの染色体MOX 遺伝子に組みこむことによるプラスミド pUR 3 1 0 5 の構築。

第12B図 プロモーターMOX - ネオマイシンホスホトランスフェラーゼアダプター断片。

第13図 公表されたアミノ酸配列から誘導される。AAO 遺伝子の DNA 配列。この遺伝子は約50ヌクレオチド長さのオリゴヌクレオチド中H. ポリモーファの最適コドンに合成する。サブクローンのために使用する制限部位を示す。HgiAI-SalI 断片は構造 AAO 遺伝子と MOX プロモーター間のアダプターを形成する。翻訳開始コドン (met) と停止コドン (\*\*\*) を示

めに使用する。HgiAI - HindIII 断片は構造 HGRF 遺伝子と MOX プロモーター間のアダプターを形成する。翻訳開始コドン (met) と停止コドン (\*\*\*) を示す。構造配列は1~140であり、MOX プロモーターは-34~-1である。

第16A図 pUR 3 2 0 3 の構築、それにより HGRF をコードする遺伝子はH. ポリモーファの染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。HGRF の免疫活性に対する選択。

第16B図 pUR 3 2 0 4 の構築、それにより HGRF をコードする遺伝子はH. ポリモーファ leu<sup>-</sup> 誘導体の染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。leu<sup>+</sup> について選択。

第16C図 pUR 3 2 0 5 の構築、それにより HGRF をコードする遺伝子は、H. ポリモーファに自律的に複製する HARS-1 - 含有プラスミドに挿入される。ura<sup>-</sup> 変異株の形質転換体により選択。

第16D図 pUR 3 2 0 9 の構築、それにより

す。構造配列は1~1044であり、MOX プロモーターは-34~-1である。

第14A図 pUR 3 0 0 3 の構築、それにより AAO 遺伝子はH. ポリモーファの染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。AAO 遺伝子の活性に関する選択。

第14B図 pUR 3 0 0 4 の構築、それにより AAO 遺伝子はH. ポリモーファ leu<sup>-</sup> 誘導体の染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。leu<sup>+</sup> についての選択。

第14C図 pURS 5 2 8 - 0 3 の構築。pCR 1 配列の除去および二重 lac UV 5 プロモーターにより、このプラスミドは pURY 5 2 8 - 0 3 より約2.2 kb 短かい。

第15図 公表されたアミノ酸配列から誘導した HGRF 遺伝子の DNA 配列。この遺伝子は約50ヌクレオチド長さのオリゴヌクレオチドにおけるH. ポリモーファの最適コドンに合成する。HgiAI、HindIII および SalI 部位はサブクローニングのため

HGRF をコードする遺伝子は、構造 MOX 遺伝子に融合した、H. ポリモーファの染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。HGRF は CNBr 分解により融合タン白質から切断する。HGRF の免疫活性に関する選択。

第16E図 pUR 3 2 1 0 の構築、それにより HGRF をコードする遺伝子は、構造 MOX 遺伝子に融合した HARS-1 - 含有プラスミドに挿入される。第16C図のように選択。

第16F図 pUR 3 2 1 1 の構築、それにより HGRF をコードする遺伝子は、構造 MOX 遺伝子に融合した、H. ポリモーファ leu<sup>-</sup> 誘導体の染色体 MOX 遺伝子に組みこむ。leu<sup>+</sup> について選択。

第17図 公表されたアミノ酸配列から誘導された、HGRF 遺伝子の DNA 配列。この遺伝子を第15図のように合成するが、構造 MOX 遺伝子のユニークな KpnI 部位に挿入できるように構築する。したがって、

遺伝子の両側に KpnI 部位を供した。

KpnI - HindIII 断片はサブクローニング用に用いた。合成は MOX 酵素に対する融合産物としてである。82 位の内部 met (ATG) は cys (TGT) に転換する。翻訳開始 (met) および停止 (\*\*\*) コドンを示す。

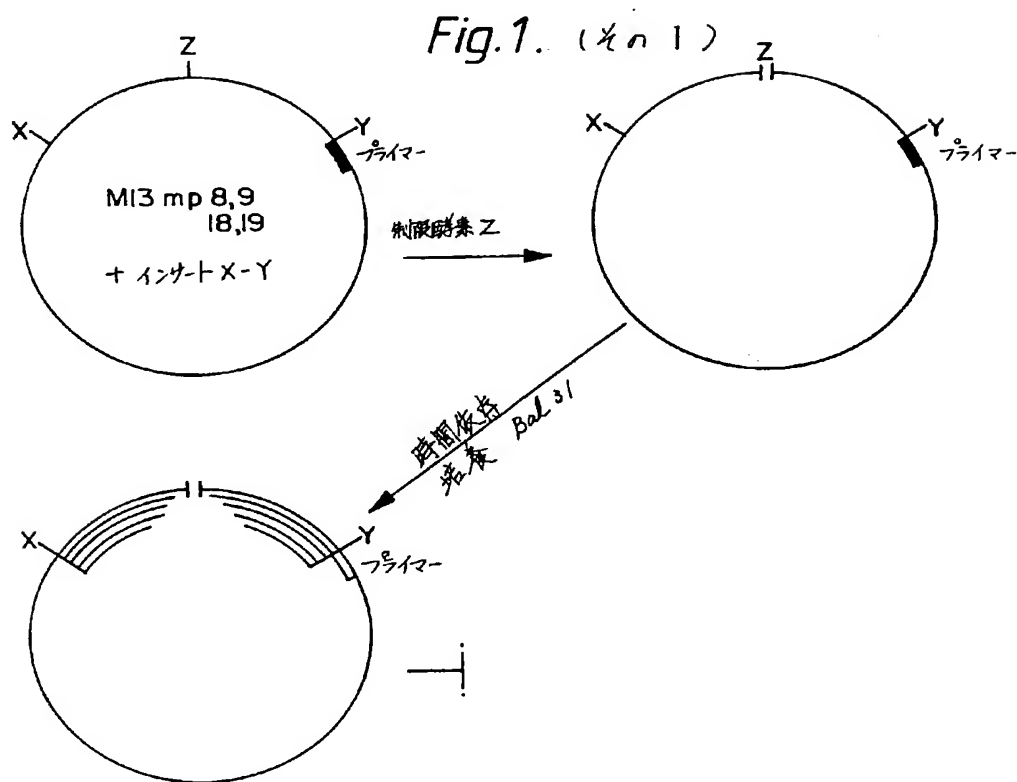
第 18 A, B, C 図 DAS 構造遺伝子のヌクレオチド配列とその 5'-および 3'-フランキング配列。

第 19 図 DAS - ラムダクローンの制限地図。唯一の適切な制限部位を示すが、MOX 遺伝子のサブクローンおよびシーケンス化に用いた。構造 DAS 配列および作った M13 サブクローンを含む開口読み取り枠が示されている。

第 20 図 DAS と MOX 遺伝子の -1000 領域における同一配列。

代理人 浅 村 皓

図面の浄書(内容に変更なし)



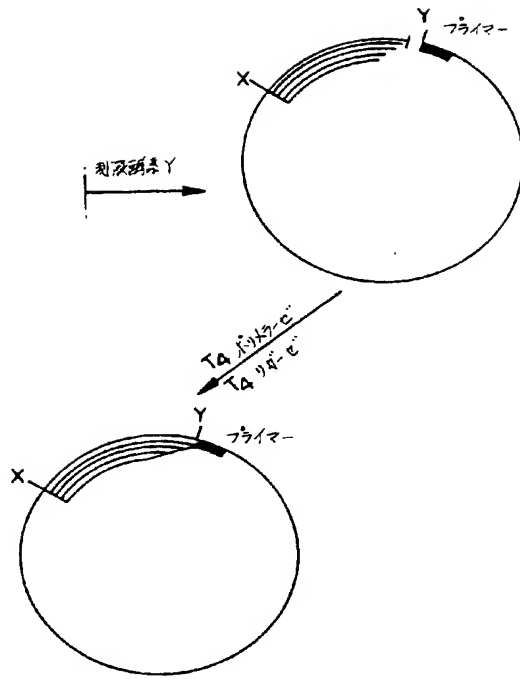


Fig.1 (x2)

Fig.2.

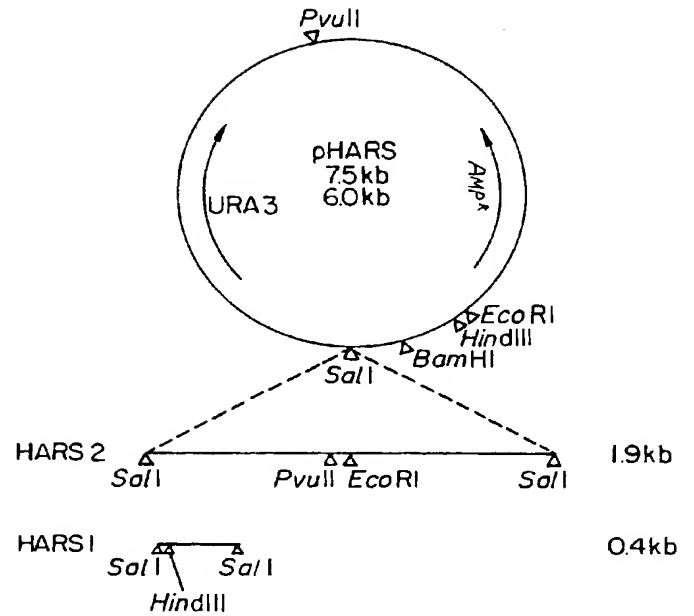


FIG. 3

↓  
 (G)TCGACTCCG CGACTCGGCG TTCACTTTTCG AGCTATTTCAT CAACGCCGGA ATACGTCAGA  
 AACAGCCGTG CCCAGGGAC CAGAAAGCCT ACTGGTGAGT ATGTTCTTTC GTGTGATTTT  
 CCGAGGATGA GACGACGATA ACGAGCACAA CTCGGAGTCG GAGGACACGC TTATTGCGTT  
 GACGAGCCAC ATCAGCAGGC TGTCAAGACT GAGTATAGGC CACAGAGCTG ATTCTGCTCA  
 TACTCAAGAC GTTAGTAAAC TCCGTCTGCC ACAATGCTGA CAGAGTATTA TAATAATAGT  
 GAATTACGAA CAATGTAGTC AAAAAAATTT AGTAACAATA TGTCATGATG ACAGATTTGC  
 TGAAACCAGT GAACTCCAAT AAATCCAGCG GCTACCGCAT CCCAAGAGAA ACAGATCAGA  
 GGTCTAGGCT TGTTTCAGAG TACTACAAGC TTTCCAGAAC TTAGCAATTC TCAAACGCCG  
 TTTGTCGAC)  
 ↓  
 483

Fig. 4.

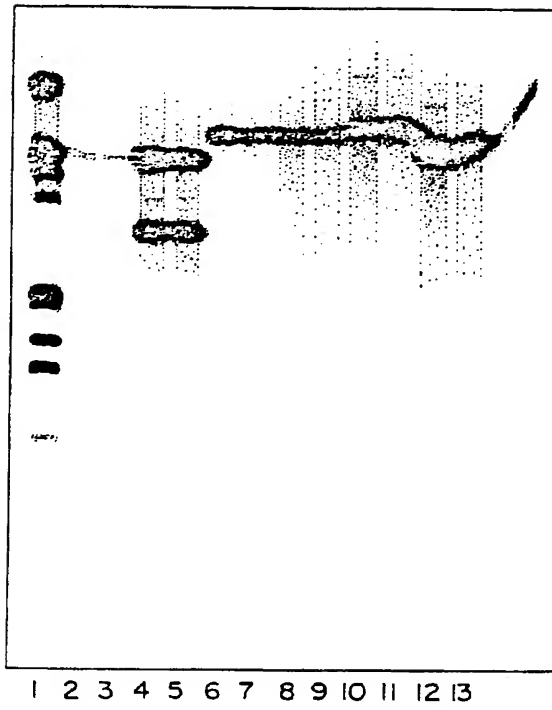


Fig. 5.

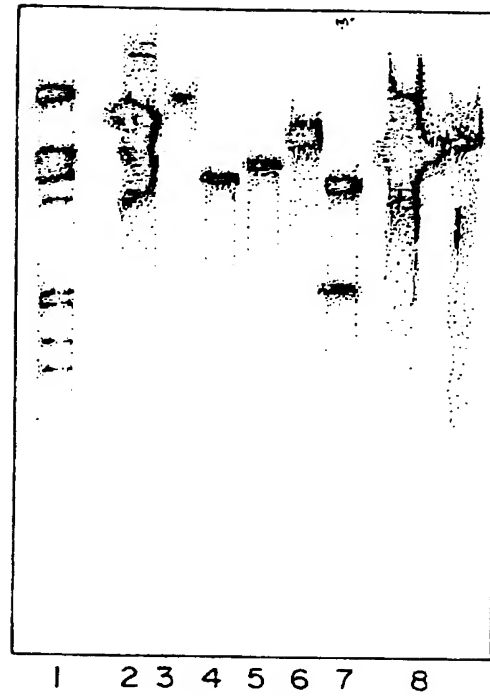


Fig. 6.

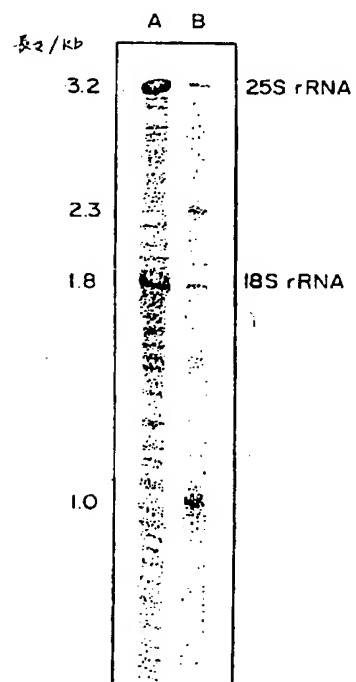
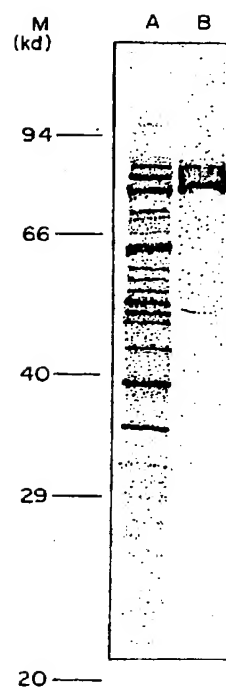


Fig. 7.



*Fig. 8.*

NH<sub>2</sub>-Ala-Ile-Pro-Asp-Glu-Phe-Asp-Ile-Ile-Val-Val-Gly-

CCA GAC GAA TTC GA

CCA GAT GAA TTC GA

-Gly-Gly- \* -Thr-Gly-Cys-Cys-Ile-Ala-Gly- \* -Leu-  
-Ala-Asn-Leu-Asp-Asp-Gln-Asn-Leu

*Fig. 9.*

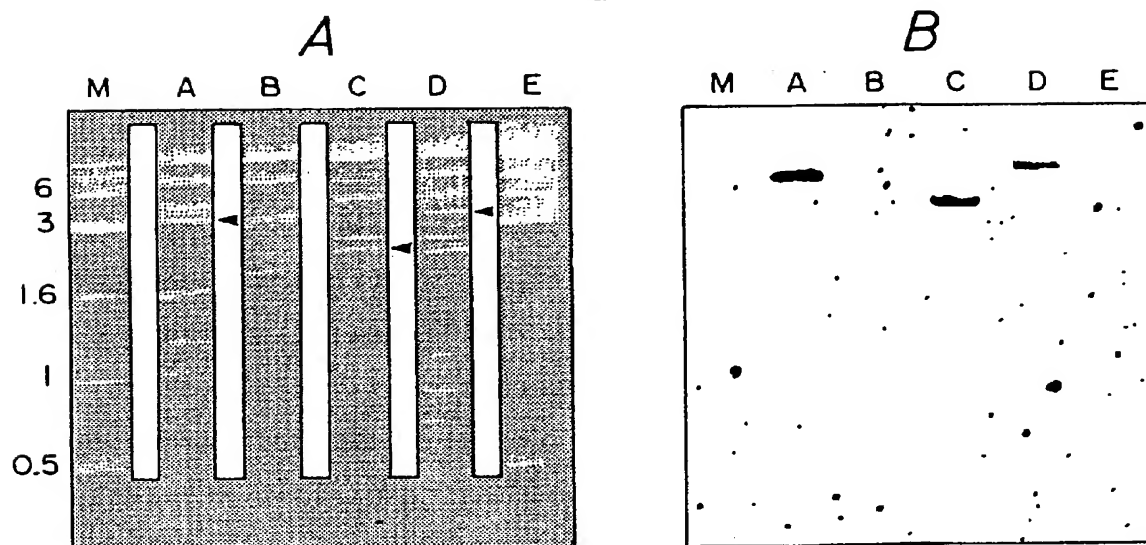


Fig.10.

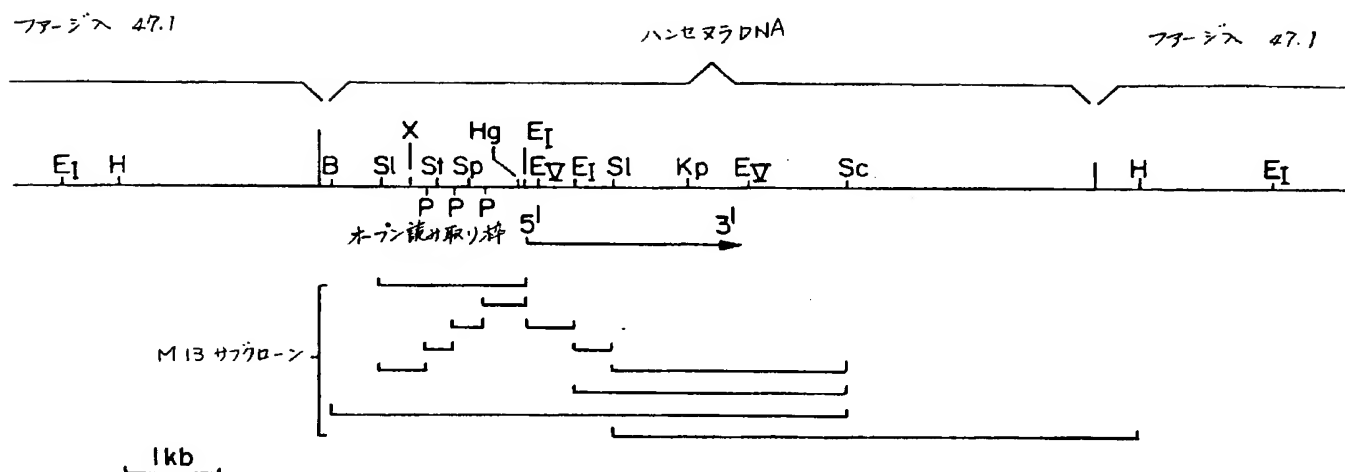


Fig.11A. (その1)

GTCGACGCGG	AGAACGATCT	CCTCGAGCTG	CTCGCGGATC	AGCTTGTGGC	CCGGTAATGG
	-1501				
AACCAGGCCG	ACGCGACGCT	CCTTGCGGAC	CACGGTGGCT	GGCGAGCCCA	GTTTGTGAAC
-1451					-1401
GAGGTCGTTT	AGAACGTCCT	CGCAAAGTC	CAGTGTGAGA	TGAATGTCCT	CCTCGGACCA
				-1351	
ATTCAGCATG	TTCTCGAGCA	GCCATCTGTC	TTTGGAGTAG	AAGCGTAATC	TCTGCTCCTC
			-1301		
GTTACTGTAC	CGGAAGAGGT	AGTTTGCCTC	GCCGCCATA	ATGAACAGGT	TCTCTTTCTG
		-1251			
GTGGCCTGTG	AGCAGCGGGG	ACGTCTGGAC	GGCGTCGATG	AGGCCCTTGA	GGCGCTCGTA
	-1201				
GTAATTGTTT	CGTCGCTGTA	GCCGGCCGCG	GTGACGATAC	CCACATAGAG	GTCCTTGGCC
-1151					-1101
ATTAGTTTGA	TGAGGTGGGG	CAGGATGGGC	GACTCGGCAT	CGAAATTTT	GCCGTCGTCG
				-1051	
TACAGTGTA	TGTCACCATC	GAATGTAATG	AGCTGCAGCT	TGCGATCTCG	GATGGTTTTG
			-1001		
GAATGGAAGA	ACCGCGACAT	CTCCAACAGC	TGGGCCGTGT	TGAGAATGAG	CCGGACGTCG
		-951			
TTGAACGAGG	GGGCCACAAG	CCGGCGTTTG	CTGATGGCGC	GCCGCTCGTC	CTCGATGTAG
	-901				
AAGGCCTTTT	CCAGAGGCAG	TCTCGTGAAG	AAGCTGCCAA	CGCTCGGAAC	CAGCTGCACG
-851					-801
AGCCGAGACA	ATTCGGGGGT	GCCGGCTTTG	GTCATTTCAA	TGTTGTCGTC	GATGAGGAGT
				-751	
TCGAGGTCGT	GGAAGATTTC	CGCGTAGCGG	CGTTTTGCCT	CAGAGTTTAC	CATGAGGTCG
			-701		



Fig. 11A. (その4)

GCT	GTG	GCC	GTG	AGA	ACA	GTG	CCA	ATG	AAG	CCT	CTG	AAC	CCT	AAG	AAG	CCT	GTG	TCC	AGA
		260					265					270					275		
THR	PHE	ARG	ALA	ARG	LYS	GLN	ILE	VAL	ILE	SER	CYS	GLY	THR	ILE	SER	SER	PRO	LEU	VAL
ACC	TTC	AGA	GCC	AGA	AAG	CAG	ATT	GTG	ATC	TCC	TGC	GGA	ACC	ATC	TCG	TCT	CCT	CTG	GTG
		280					285					290					295		
LEU	GLN	ARG	SER	GLY	ILE	GLY	ALA	ALA	HIS	HIS	LEU	ARG	SER	VAL	GLY	VAL	LYS	PRO	ILE
CTC	CAG	AGA	TCT	GGT	ATT	GGT	GCA	GCT	CAC	CAC	TTG	AGA	TCC	GTG	GGG	CTC	AAG	CCA	ATC

Fig. 11B. (その1)

		300					305				310					315			
VAL	ASP	LEU	PRO	GLY	VAL	GLY	GLU	ASN	PHE	GLN	ASP	HIS	TYR	CYS	PHE	PHE	THR	PRO	TYR
GTC	GAC	CTG	CCA	GGT	GTG	GGT	GAG	AAT	TTC	CAG	GAC	CAC	TAC	TGT	TTC	TTC	ACT	CCA	TAC
		320					325					330					335		
TYR	VAL	LYS	PRO	ASP	VAL	PRO	THR	PHE	ASP	ASP	PHE	VAL	ARG	GLY	ASP	PRO	VAL	ALA	GLN
TAC	GTC	AAG	CCT	GAC	GTT	CCT	ACG	TTC	GAC	GAC	TTT	GTC	AGG	GGC	GAC	CCA	GTT	CCC	CAG
		340					345					350					355		
LYS	ALA	ALA	PHE	ASP	GLN	TRP	TYR	SER	ASN	LYS	ASP	GLY	PRO	LEU	THR	THR	ASN	GLY	ILE
AAG	GCC	GCT	TTC	GAC	CAG	TGG	TAC	TCC	AAC	AAG	GAC	GGT	CCA	TTG	ACC	ACC	AAC	GGT	ATT
		360					365					370					375		
GLU	ALA	GLY	VAL	LYS	ILE	ARG	PRO	THR	GLU	GLU	GLU	LEU	ALA	THR	ALA	ASP	GLU	ASP	PHE
GAA	GCC	GGA	GTC	AAG	ATC	AGA	CCT	ACC	GAA	GAG	GAG	CTG	GCT	ACC	GCG	GAC	GAG	GAC	TTC
		380					385					390					395		
ARG	ARG	GLY	TYR	ALA	GLU	TYR	PHE	GLU	ASN	LYS	PRO	ASP	LYS	PRO	LEU	MET	HIS	TYR	SER
AGA	CGC	GGC	TAC	GCA	GAG	TAC	TTC	GAG	AAC	AAG	CCA	GAC	AAG	CCT	CTG	ATG	CAC	TAC	TCT
		400					405					410					415		
VAL	ILE	SER	GLY	PHE	PHE	GLY	ASP	HIS	THR	LYS	ILE	PRO	ASN	GLY	LYS	PHE	MET	THR	MET
GTC	ATC	TCC	GGC	TTC	TTT	GGA	GAC	CAC	ACC	AAG	ATT	CCT	AAC	GGC	AAG	TTC	ATC	ACC	ATG
		420					425					430					435		
PHE	HIS	PHE	LEU	GLU	TYR	PRO	PHE	SER	ARG	GLY	PHE	VAL	ARG	ILE	THR	SER	ALA	ASN	PRO
TTC	CAC	TTC	CTG	GAG	TAT	CCA	TTC	TCC	AGA	GGA	TTT	GTT	AGA	ATC	ACC	TCG	GCA	AAC	CCA
		440					445					450					455		



Fig.11B. (402)

440	445	450	455
TYR ASP ALA PRO ASP PHE ASP PRO GLY PHE LEU ASN ASP GLU ARG ASP LEU TRP PRO MET	TYR ASP ALA PRO ASP PHE ASP PRO GLY PHE LEU ASN ASP GLU ARG ASP LEU TRP PRO MET	TYR ASP ALA PRO ASP PHE ASP PRO GLY PHE LEU ASN ASP GLU ARG ASP LEU TRP PRO MET	TYR ASP ALA PRO ASP PHE ASP PRO GLY PHE LEU TRP PRO MET
TAC GAC GCT CCT GAC TTC GAT CCC GGC TTC CTC AAT GAC GAA AGA GAC CTG TGG CCT ATG	TAC GAC GCT CCT GAC TTC GAT CCC GGC TTC CTC AAT GAC GAA AGA GAC CTG TGG CCT ATG	TAC GAC GCT CCT GAC TTC GAT CCC GGC TTC CTC AAT GAC GAA AGA GAC CTG TGG CCT ATG	TAC GAC GCT CCT GAC TTC GAT CCC GGC TTC CTC AAT GAC GAA AGA GAC CTG TGG CCT ATG
460	465	470	475
VAL TRP ALA TYR LYS LYS SER ARG GLU THR ALA ARG ARG MET GLU SER PHE ALA GLY GLU	VAL TRP ALA TYR LYS LYS SER ARG GLU THR ALA ARG ARG MET GLU SER PHE ALA GLY GLU	VAL TRP ALA TYR LYS LYS SER ARG GLU THR ALA ARG ARG MET GLU SER PHE ALA GLY GLU	VAL TRP ALA TYR LYS LYS SER ARG GLU THR ALA ARG ARG MET GLU SER PHE ALA GLY GLU
GTC TGG GCA TAC AAG AAG TCC AGA GAG ACG GCC AGA AGA ATG GAG AGC TTT GCA GGA GAG	GTC TGG GCA TAC AAG AAG TCC AGA GAG ACG GCC AGA AGA ATG GAG AGC TTT GCA GGA GAG	GTC TGG GCA TAC AAG AAG TCC AGA GAG ACG GCC AGA AGA ATG GAG AGC TTT GCA GGA GAG	GTC TGG GCA TAC AAG AAG TCC AGA GAG ACG GCC AGA AGA ATG GAG AGC TTT GCA GGA GAG
480	485	490	495
VAL THR SER HIS HIS PRO LEU PHE LYS VAL ASP SER PRO ALA ARG ALA ARG ASP LEU ASP	VAL THR SER HIS HIS PRO LEU PHE LYS VAL ASP SER PRO ALA ARG ALA ARG ASP LEU ASP	VAL THR SER HIS HIS PRO LEU PHE LYS VAL ASP SER PRO ALA ARG ALA ARG ASP LEU ASP	VAL THR SER HIS HIS PRO LEU PHE LYS VAL ASP SER PRO ALA ARG ALA ARG ASP LEU ASP
GTC ACC TCG CAC CAC CCA TTG TTC AAG GTT GAC TCG CCA GCC AGA GCC AGA GAC CTG GAC	GTC ACC TCG CAC CAC CCA TTG TTC AAG GTT GAC TCG CCA GCC AGA GCC AGA GAC CTG GAC	GTC ACC TCG CAC CAC CCA TTG TTC AAG GTT GAC TCG CCA GCC AGA GCC AGA GAC CTG GAC	GTC ACC TCG CAC CAC CCA TTG TTC AAG GTT GAC TCG CCA GCC AGA GCC AGA GAC CTG GAC
500	505	510	515
LEU GLU THR CYS SER ALA TYR ALA GLY PRO LYS HIS LEU THR ALA ASN LEU TYR HIS GLY	LEU GLU THR CYS SER ALA TYR ALA GLY PRO LYS HIS LEU THR ALA ASN LEU TYR HIS GLY	LEU GLU THR CYS SER ALA TYR ALA GLY PRO LYS HIS LEU THR ALA ASN LEU TYR HIS GLY	LEU GLU THR CYS SER ALA TYR ALA GLY PRO LYS HIS LEU THR ALA ASN LEU TYR HIS GLY
CTC GAG ACA TGC AGT GCA TAT GCC GGT CCT AAG CAC CTC ACT GCC AAC CTG TAC CAC GGC	CTC GAG ACA TGC AGT GCA TAT GCC GGT CCT AAG CAC CTC ACT GCC AAC CTG TAC CAC GGC	CTC GAG ACA TGC AGT GCA TAT GCC GGT CCT AAG CAC CTC ACT GCC AAC CTG TAC CAC GGC	CTC GAG ACA TGC AGT GCA TAT GCC GGT CCT AAG CAC CTC ACT GCC AAC CTG TAC CAC GGC
520	525	530	535
SER TRP THR VAL PRO ILE ASP LYS PRO THR PRO LYS ASN ASP PHE HIS VAL THR SER ASN	SER TRP THR VAL PRO ILE ASP LYS PRO THR PRO LYS ASN ASP PHE HIS VAL THR SER ASN	SER TRP THR VAL PRO ILE ASP LYS PRO THR PRO LYS ASN ASP PHE HIS VAL THR SER ASN	SER TRP THR VAL PRO ILE ASP LYS PRO THR PRO LYS ASN ASP PHE HIS VAL THR SER ASN
TCG TGG ACC GTT CCT ATC GAC AAG CCA ACG CCT AAG AAC GAT TTC CAC GTG ACC TCC AAC	TCG TGG ACC GTT CCT ATC GAC AAG CCA ACG CCT AAG AAC GAT TTC CAC GTG ACC TCC AAC	TCG TGG ACC GTT CCT ATC GAC AAG CCA ACG CCT AAG AAC GAT TTC CAC GTG ACC TCC AAC	TCG TGG ACC GTT CCT ATC GAC AAG CCA ACG CCT AAG AAC GAT TTC CAC GTG ACC TCC AAC
540	545	550	555
GLN VAL GLN LEU HIS SER ASP ILE GLU TYR THR GLU GLU ASP ASP GLU ALA ILE VAL ASN	GLN VAL GLN LEU HIS SER ASP ILE GLU TYR THR GLU GLU ASP ASP GLU ALA ILE VAL ASN	GLN VAL GLN LEU HIS SER ASP ILE GLU TYR THR GLU GLU ASP ASP GLU ALA ILE VAL ASN	GLN VAL GLN LEU HIS SER ASP ILE GLU TYR THR GLU GLU ASP ASP GLU ALA ILE VAL ASN
CAA GTC CAA CTG CAC TCC GAC ATC GAG TAC ACC GAG GAG GAC GAC GAG GCC ATC GTC AAC	CAA GTC CAA CTG CAC TCC GAC ATC GAG TAC ACC GAG GAG GAC GAC GAG GCC ATC GTC AAC	CAA GTC CAA CTG CAC TCC GAC ATC GAG TAC ACC GAG GAG GAC GAC GAG GCC ATC GTC AAC	CAA GTC CAA CTG CAC TCC GAC ATC GAG TAC ACC GAG GAG GAC GAC GAG GCC ATC GTC AAC
560	565	570	575
TYR ILE LYS GLU HIS THR GLU THR THR TRP HIS CYS LEU GLY THR CYS SER MET ALA PRO	TYR ILE LYS GLU HIS THR GLU THR THR TRP HIS CYS LEU GLY THR CYS SER MET ALA PRO	TYR ILE LYS GLU HIS THR GLU THR THR TRP HIS CYS LEU GLY THR CYS SER MET ALA PRO	TYR ILE LYS GLU HIS THR GLU THR THR TRP HIS CYS LEU GLY THR CYS SER MET ALA PRO
TAC ATT AAG GAA CAC ACC GAG ACC ACT TGG CAC TGT CTG GGT ACC TGC TCG ATG GCC CCA	TAC ATT AAG GAA CAC ACC GAG ACC ACT TGG CAC TGT CTG GGT ACC TGC TCG ATG GCC CCA	TAC ATT AAG GAA CAC ACC GAG ACC ACT TGG CAC TGT CTG GGT ACC TGC TCG ATG GCC CCA	TAC ATT AAG GAA CAC ACC GAG ACC ACT TGG CAC TGT CTG GGT ACC TGC TCG ATG GCC CCA
580	585	590	595
ARG GLU GLY SER LYS ILE ALA PRO LYS GLY GLY VAL LEU ASP ALA ARG LEU ASN VAL TYR	ARG GLU GLY SER LYS ILE ALA PRO LYS GLY GLY VAL LEU ASP ALA ARG LEU ASN VAL TYR	ARG GLU GLY SER LYS ILE ALA PRO LYS GLY GLY VAL LEU ASP ALA ARG LEU ASN VAL TYR	ARG GLU GLY SER LYS ILE ALA PRO LYS GLY GLY VAL LEU ASP ALA ARG LEU ASN VAL TYR
AGA GAG GGT AGT AAG ATT GCT CCT AAG GGA GGT GTC TTG GAC GCC AGA CTG AAC GTT TAC	AGA GAG GGT AGT AAG ATT GCT CCT AAG GGA GGT GTC TTG GAC GCC AGA CTG AAC GTT TAC	AGA GAG GGT AGT AAG ATT GCT CCT AAG GGA GGT GTC TTG GAC GCC AGA CTG AAC GTT TAC	AGA GAG GGT AGT AAG ATT GCT CCT AAG GGA GGT GTC TTG GAC GCC AGA CTG AAC GTT TAC
600	605	610	615
GLY VAL GLN ASN LEU LYS VAL ALA ASP LEU SER VAL CYS PRO ASP ASN VAL GLY CYS ASN	GLY VAL GLN ASN LEU LYS VAL ALA ASP LEU SER VAL CYS PRO ASP ASN VAL GLY CYS ASN	GLY VAL GLN ASN LEU LYS VAL ALA ASP LEU SER VAL CYS PRO ASP ASN VAL GLY CYS ASN	GLY VAL GLN ASN LEU LYS VAL ALA ASP LEU SER VAL CYS PRO ASP ASN VAL GLY CYS ASN

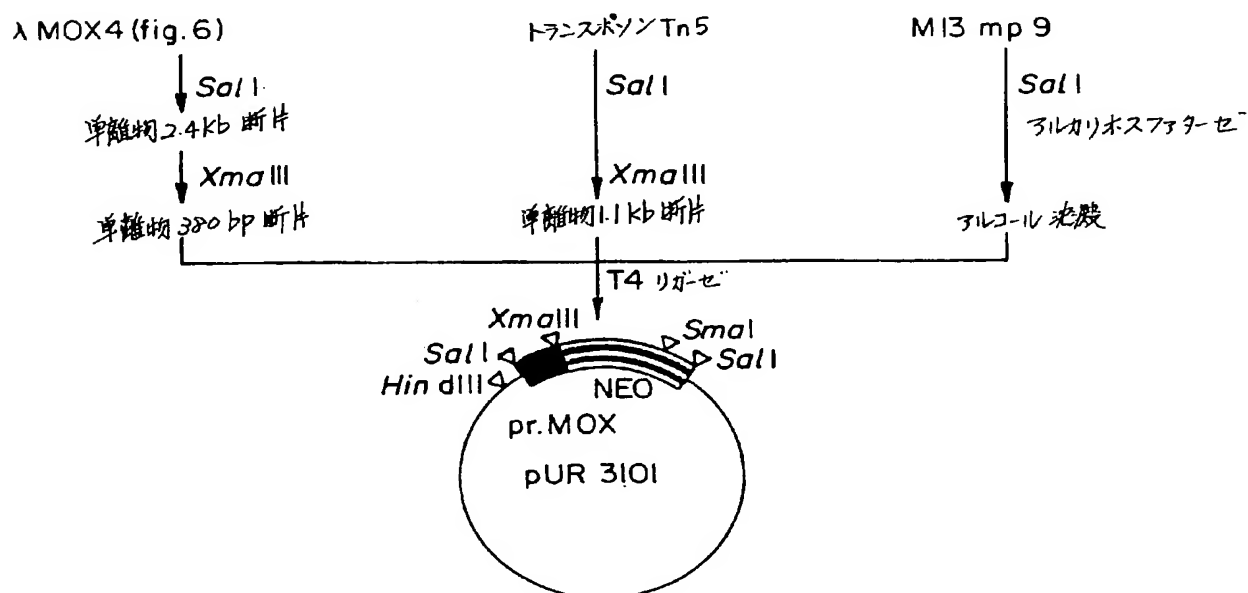
Fig.11B. (403)

GGA GTC CAG AAC CTC AAG GTT GCG GAC CTT TCT GTT TGT CCC GAC AAC GTT GGA TGC AAC	GGA GTC CAG AAC CTC AAG GTT GCG GAC CTT TCT GTT TGT CCC GAC AAC GTT GGA TGC AAC	GGA GTC CAG AAC CTC AAG GTT GCG GAC CTT TCT GTT TGT CCC GAC AAC GTT GGA TGC AAC	GGA GTC CAG AAC CTC AAG GTT GCG GAC CTT TCT GTT TGT CCC GAC AAC GTT GGA TGC AAC
620	625	630	635
THR TYR SER THR ALA LEU THR ILE GLY GLU LYS ALA ALA THR LEU VAL ALA GLU ASP LEU	THR TYR SER THR ALA LEU THR ILE GLY GLU LYS ALA ALA THR LEU VAL ALA GLU ASP LEU	THR TYR SER THR ALA LEU THR ILE GLY GLU LYS ALA ALA THR LEU VAL ALA GLU ASP LEU	THR TYR SER THR ALA LEU THR ILE GLY GLU LYS ALA ALA THR LEU VAL ALA GLU ASP LEU
ACC TAC TCT ACT GCA TTG ACC ATC GGT GAG AAG GCT GCC ACT CTT GTT GCT GAA GAT CTT	ACC TAC TCT ACT GCA TTG ACC ATC GGT GAG AAG GCT GCC ACT CTT GTT GCT GAA GAT CTT	ACC TAC TCT ACT GCA TTG ACC ATC GGT GAG AAG GCT GCC ACT CTT GTT GCT GAA GAT CTT	ACC TAC TCT ACT GCA TTG ACC ATC GGT GAG AAG GCT GCC ACT CTT GTT GCT GAA GAT CTT
640	645	650	655
GLY TYR SER GLY SER ASP LEU ASP MET THR ILE PRO ASN PHE ARG LEU GLY THR TYR GLU	GLY TYR SER GLY SER ASP LEU ASP MET THR ILE PRO ASN PHE ARG LEU GLY THR TYR GLU	GLY TYR SER GLY SER ASP LEU ASP MET THR ILE PRO ASN PHE ARG LEU GLY THR TYR GLU	GLY TYR SER GLY SER ASP LEU ASP MET THR ILE PRO ASN PHE ARG LEU GLY THR TYR GLU
GGC TAC TCA GGC TCC GAC CTG GAC ATG ACG ATT CCA AAC TTC AGA CTC GGA ACT TAC GAG	GGC TAC TCA GGC TCC GAC CTG GAC ATG ACG ATT CCA AAC TTC AGA CTC GGA ACT TAC GAG	GGC TAC TCA GGC TCC GAC CTG GAC ATG ACG ATT CCA AAC TTC AGA CTC GGA ACT TAC GAG	GGC TAC TCA GGC TCC GAC CTG GAC ATG ACG ATT CCA AAC TTC AGA CTC GGA ACT TAC GAG
660	665	670	675
GLU THR GLY LEU ALA ARG PHE ***	GLU THR GLY LEU ALA ARG PHE ***	GLU THR GLY LEU ALA ARG PHE ***	GLU THR GLY LEU ALA ARG PHE ***
GAG ACC GGA CTT GCC AGA TTC TAA GGAG ACGTGGAAGG ACATACCGCT TTTGAGAAGC	GAG ACC GGA CTT GCC AGA TTC TAA GGAG ACGTGGAAGG ACATACCGCT TTTGAGAAGC	GAG ACC GGA CTT GCC AGA TTC TAA GGAG ACGTGGAAGG ACATACCGCT TTTGAGAAGC	GAG ACC GGA CTT GCC AGA TTC TAA GGAG ACGTGGAAGG ACATACCGCT TTTGAGAAGC
2000	2005	2010	2015
GTGTTTGA AAA ATAGTTCTTT TTCTGGTTTA TATCGTTTAT GAAGTGATGA GATGAAAAGC	GTGTTTGA AAA ATAGTTCTTT TTCTGGTTTA TATCGTTTAT GAAGTGATGA GATGAAAAGC	GTGTTTGA AAA ATAGTTCTTT TTCTGGTTTA TATCGTTTAT GAAGTGATGA GATGAAAAGC	GTGTTTGA AAA ATAGTTCTTT TTCTGGTTTA TATCGTTTAT GAAGTGATGA GATGAAAAGC
2050	2055	2060	2065
TGAAATAGCG AGTATAGGAA AATTTAATGA AAATTAAATT AAATATTTTC TTAGGCTATT	TGAAATAGCG AGTATAGGAA AATTTAATGA AAATTAAATT AAATATTTTC TTAGGCTATT	TGAAATAGCG AGTATAGGAA AATTTAATGA AAATTAAATT AAATATTTTC TTAGGCTATT	TGAAATAGCG AGTATAGGAA AATTTAATGA AAATTAAATT AAATATTTTC TTAGGCTATT
2100	2105	2110	2115
AGTCACCTTC AAAATGCCGG CCGCTTCTAA GAACGTTGTC ATGATCCACA ACTACGACTC	AGTCACCTTC AAAATGCCGG CCGCTTCTAA GAACGTTGTC ATGATCCACA ACTACGACTC	AGTCACCTTC AAAATGCCGG CCGCTTCTAA GAACGTTGTC ATGATCCACA ACTACGACTC	AGTCACCTTC AAAATGCCGG CCGCTTCTAA GAACGTTGTC ATGATCCACA ACTACGACTC
2150	2155	2160	2165
GTTTACCTGG AACCTGTACG AGTACCTGTG TCAGGAGGGA GCCAATGTCT AGGTTTTTCAG	GTTTACCTGG AACCTGTACG AGTACCTGTG TCAGGAGGGA GCCAATGTCT AGGTTTTTCAG	GTTTACCTGG AACCTGTACG AGTACCTGTG TCAGGAGGGA GCCAATGTCT AGGTTTTTCAG	GTTTACCTGG AACCTGTACG AGTACCTGTG TCAGGAGGGA GCCAATGTCT AGGTTTTTCAG
2200	2205	2210	2215
GAACGATCAG ATCACCATTG CCGAGATTGA GCAGCTCAAG CCGGACGTTG TGGTGATATC	GAACGATCAG ATCACCATTG CCGAGATTGA GCAGCTCAAG CCGGACGTTG TGGTGATATC	GAACGATCAG ATCACCATTG CCGAGATTGA GCAGCTCAAG CCGGACGTTG TGGTGATATC	GAACGATCAG ATCACCATTG CCGAGATTGA GCAGCTCAAG CCGGACGTTG TGGTGATATC
2250	2255	2260	2265
CCCTGGTCCT GGCCATCCAA GAACAGACTC GGGAATATCT CCGGACGTGA TCAGCCATTT	CCCTGGTCCT GGCCATCCAA GAACAGACTC GGGAATATCT CCGGACGTGA TCAGCCATTT	CCCTGGTCCT GGCCATCCAA GAACAGACTC GGGAATATCT CCGGACGTGA TCAGCCATTT	CCCTGGTCCT GGCCATCCAA GAACAGACTC GGGAATATCT CCGGACGTGA TCAGCCATTT
2300	2305	2310	2315
TAAAGGCAAG ATTCTGTCTG TTGGTGTCTG TATGGGCCAG CAGTGTATCT TCGAGGAGTT	TAAAGGCAAG ATTCTGTCTG TTGGTGTCTG TATGGGCCAG CAGTGTATCT TCGAGGAGTT	TAAAGGCAAG ATTCTGTCTG TTGGTGTCTG TATGGGCCAG CAGTGTATCT TCGAGGAGTT	TAAAGGCAAG ATTCTGTCTG TTGGTGTCTG TATGGGCCAG CAGTGTATCT TCGAGGAGTT
2350	2355	2360	2365
TGGCGGAGAC GTCGAGTATG CCGGCGAGAT TGTCCATGGA AAAACGTCCA CTGTTAAGCA	TGGCGGAGAC GTCGAGTATG CCGGCGAGAT TGTCCATGGA AAAACGTCCA CTGTTAAGCA	TGGCGGAGAC GTCGAGTATG CCGGCGAGAT TGTCCATGGA AAAACGTCCA CTGTTAAGCA	TGGCGGAGAC GTCGAGTATG CCGGCGAGAT TGTCCATGGA AAAACGTCCA CTGTTAAGCA
2400	2405	2410	2415
2450	2455	2460	2465

Fig. 11B. (4 of 4)

CGACAACAAG	GGAATGTTCA	AAAACGTTCC	GCAAGATGTT	GCTGTCACCA 2550	GATACCACTC
GCTGGCCGGA	ACGCTCAAGT	CGCTTCCGGA	CTGTCTAGAG 2600	ATCACTGCTC	GCACAGACAA
CGGGATCATT	ATGGGTGTGA	GACACAAGAA 2650	GTACACCATC	GAGGGCGTCC	AGTTTCATCC
AGAGAGCATT	CTGACCGAGG 2700	AGGGCCATCT	GATGATCCAG	AATATCCTCA	ACGTTTCCGG
TGGTTACTGG 2750	GAGGAAAATG	CCAACGGCGC	GGCTCAGAGA	AAGGAAAGCA	TATTGGAGAA 2800
AATATACGCG	CAGAGACGAA	AAGACTACGA	GTTTGAGATG	AACAGACCGG 2850	GGCGCAGATT
TGCTGATCTA	GAACTGTACT	TGTCCATGGG	ACTGCACCGC 2900	CGCTAATCAA	TTTTTACGAC
AGATTGGAGC	AGAACATCAG	CGCCGGCAAG 2950	GTTGCAATTC	TCAGCGAAAT	CAAGAGAGCG
TCGCCTTCTA	AAGGCGTCAT 3000	CGACGGAGAC	GCTAACGCTG	CCAAACAGGC	CCTCAACTAC
GCCAAGGCTG 3050	GAGTTGCCAC	AATTTCTGTT	TTGACCGAGC	CAACCTGGTT	TAAAGGAAAT 3100
ATCCAGGACC	TGGAGGTGGC	CAGAAAAGCC	ATTGACTCTG	TGGCCAATAG 3150	ACCGTGTATT
TTGCGGAAGG	AGTTTATCTT	CAACAAGTAC	CAAATTCTAG 3200	AGGCCCGACT	GGCGGGAGCA
GACACGGTTC	TGCTGATTGT	CAAGATGCTG 3250	AGCTC		

Fig. 12A. (その1)



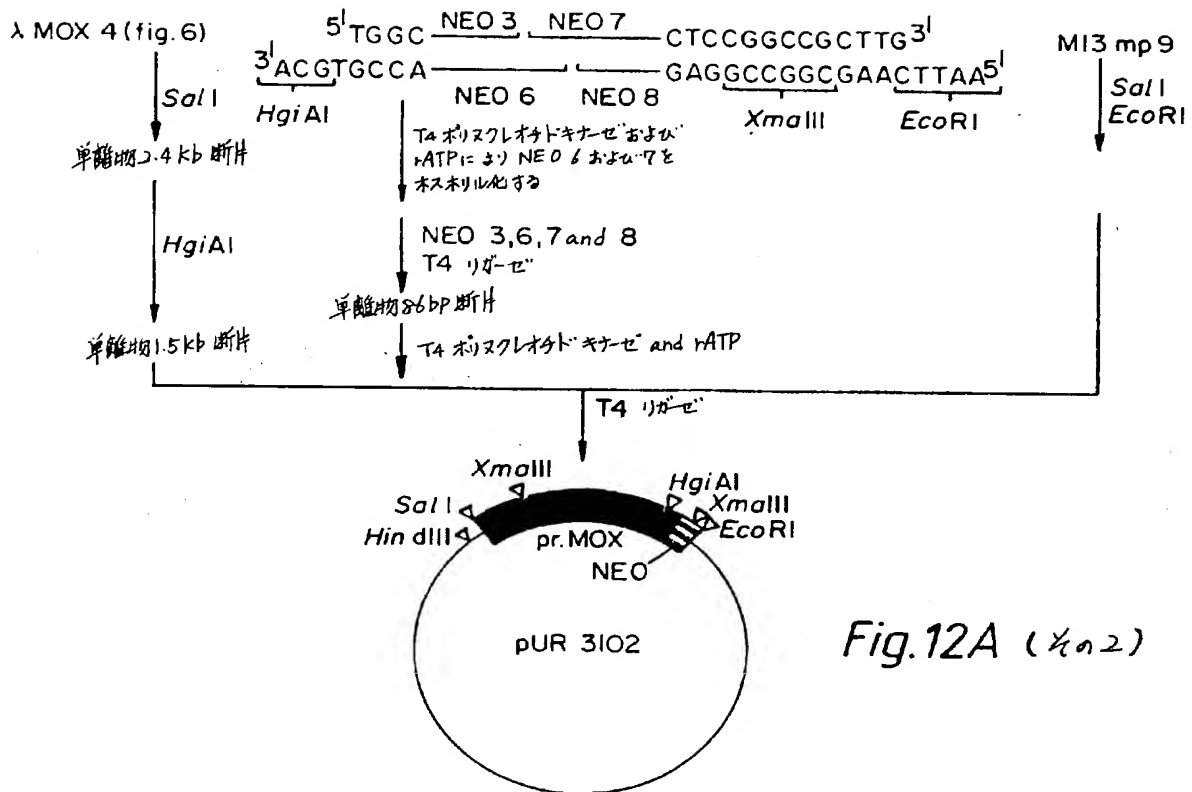


Fig. 12A (その2)

Fig. 12B.

NEO3 5' CGGTGGTGACATCAATCTAAAGTACAAA 3'

NEO6 5' TCATTTTGT TTTTGTACTTTAGATTGATGTCACCACCGTGCA 3'

NEO7 5' AACAAAATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTG 3'

NEO8 5' AATTCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAA 3'

Fig.12C. (その1)

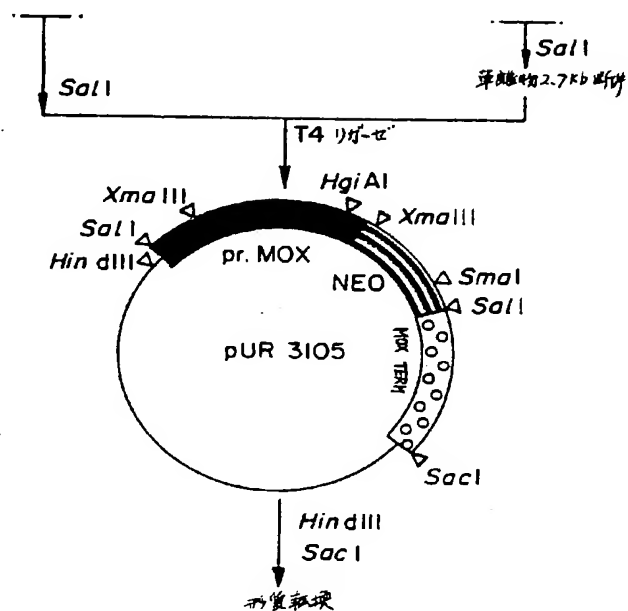
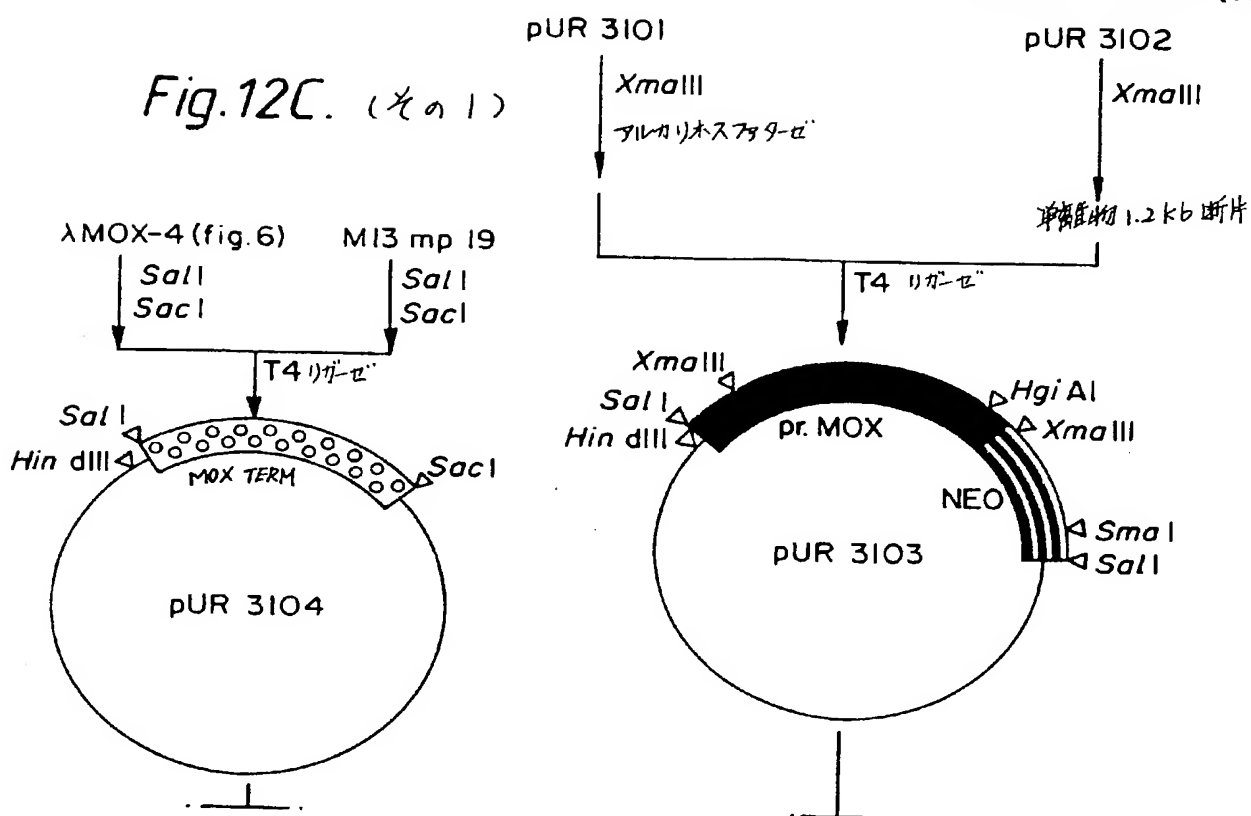


Fig.12C (その2)

Fig.13 (No.1)

<----- 70E-9 MOX/AAO 3379- ----->  
 -34 1  
 CCGTGG TGACATCAAT CTAAAGTACA AAAACAAAAT GAGAGTTGTC GTTATTGGTG  
 ACGTGCCACC ACTGTAGTTA GATTTCATGT TTTTGTTTTA CTCTCAACAG CAATAACCAC  
HgiAI Met  
 <<----->  
 62  
 CCGGTGTCAT CCGTCTGTCTG ACCGCCCTGT GTATCCACGA GAGATACCAC TCCGTTCTGC  
 GGCCACAGTA GCCAGACAGC TGGCGGGACA CATAGGTGCT CTCTATGGTG AGGCAAGACG  
SaII  
 122  
 AGCCTCTGGA CGTTAAGGTC TACGCCGACA GATTCACCCC TTTCACCACC ACCGACGTTG  
 TCGGAGACCT GCAATTCCAG ATGCGGCTGT CTAAGTGGGG AAAGTGGTGG TGGCTGCAAC  
 182  
 CCGCCGGTCT GTGGCAGCCT TACACCTCCG AGCCTTCCAA CCCTCAGGAG GCCAACTGGA  
 GGCGGCCAGA CACCGTCGGA ATGTGGAGGC TCGGAAGGTT GGGAGTCCTC CGGTTGACCT  
 242  
 ACCAGCAGAC CTTCAACTAC CTCCTCTCCC ACATCGGTTT GCCTAACGCC GCCAACATGG  
 TGGTCGTCTG GAAGTTGATG GAGGAGAGGG TGTAGCCAAG CGGATTGCGG CGGTTGTACC  
 302  
 GTCTGACCCC TGTCTCGGGT TACAACCTGT TCAGAGAGGC CGTTCCTGAC CTTACTGGA  
 CAGACTGGGG ACAGAGCCCA ATGTTGGACA AGTCTCTCCG GCAAGGACTG GGAATGACCT

Fig.13 (No.2)

362  
 AGGACATGGT CCTCGGTTTC AGAAAGCTTA CCCCTAGAGA GCTGGACATG TTCCCTGACT  
 TCCTGTACCA GGAGCCAAAG TCTTTTGAAT GGGGATCTCT CGACCTGTAC AAGGGACTGA  
HindIII  
 422  
 ACAGATACGG TTGGTTCAAC ACCTCCCTGA TCCTGGAGGG TAGAAAGTAC CTGCAGTGGC  
 TGTCTATGCC AACCAAGTTG TGGAGGGACT AGGACCTCCC ATCTTTCATG GACGTCACCG  
 482  
 TGACCGAGAG ACTGACCGAG AGAGGTGTTA AGTTCTTCCT GAGAAAGGTC GAGTCCTTCG  
 ACTGGCTCTC TGA CTGGCTC TCTCCACAAT TCAAGAAGGA CTCTTTCCAG CTCAGGAAGC  
 542  
 AGGAGGTTGC CAGAGGTGGT GCCGACGTCA TCATCATGTG TACCGGTGTC TGGGCGGGTG  
 TCCTCCAACG GTCTCCACCA CGGCTGCAGT AGTAGTACAC ATGGCCACAG ACCCGGCCAC  
 602  
 TCCTGCAGCC TGACCCCTCTG CTGCAGCCCG GGAGAGGTCA GATCATTAAAG GTTGACGCCC  
 AGGACGTCGG ACTGGGAGAC GACGTCTGGG CCTCTCCAGT CTAGTAATTC CAACTGCGGG  
XmaI  
 662  
 CATGCCGAA GAACTTCATC ATTACCCACG ACCTGGAGAG AGGTATCTAC AACTCCCTT  
 GTACCGACTT CTGAAGTAG TAATGGGTGC TGGACCTCTC TCCATAGATG TTGAGGGGAA  
 722  
 ACATTATCCC TGGTCTGCAG CCGCTCACCC TGGGTGGTAC CTTCCAGGTC GGTAACCTGA  
 TGTAATAGGG ACAGAGCGTC CGGCAGTGGG ACCCACCATG GAAGGTCCAG CCATTGACCT  
KpnI

Fig.13 (その3)

782  
 ACGAGATCAA CAACATCCAG GACCACAACA CCATCTGGGA GGGTTGTTGT AGACTGGAGC  
 TGCTCTAGTT GTTGTAGGTC CTGGTGTTGT GGTAGACCCT CCCAACAACA TCTGACCTCG

842  
 CTACCCTGAA GGACGCCAAG ATCGTTGGTG AGTACACCGG TTTCAGACCT GTTAGACCTC  
 GATGGGACTT CCTGCGGTTC TAGCAACCAC TCATGTGGCC AAAGTCTGGA CAATCTGGAG

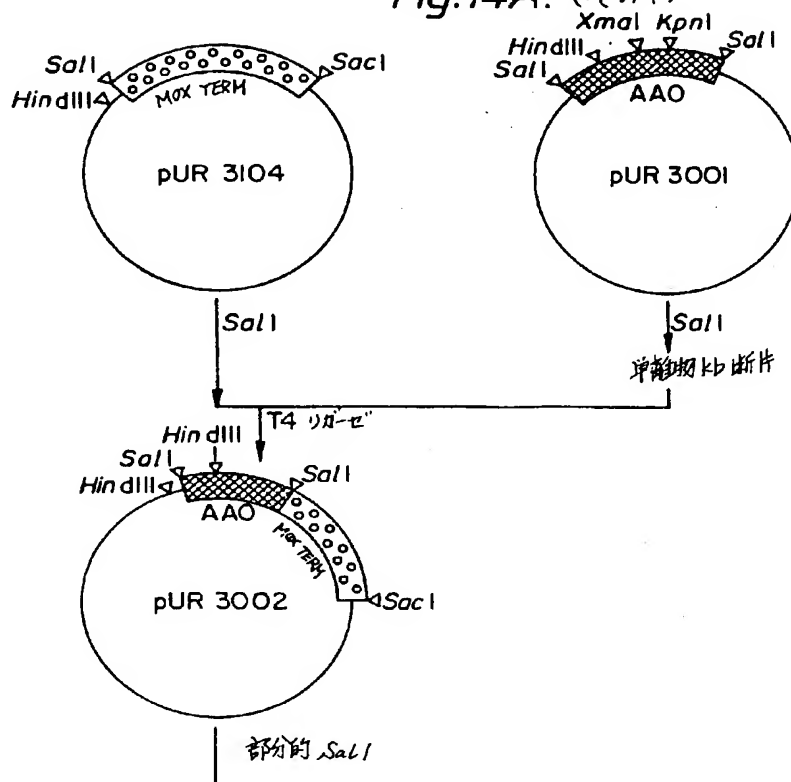
902  
 AGGTCAGACT GGAGAGAGAG CAGCTGAGAT TCGGTTTCCTC CAACACCGAG GTCATTCACA  
 TCCAGTCTGA CCTCTCTCTC GTCGACTCTA AGCCAAGGAG GTTGTGGCTC CAGTAAGTGT

962  
 ACTACGGTCA CGGTGGTTAC GGTCTGACCA TCCACTTGGG TTGTGCCCTG GAGGTTGCCA  
 TGATGCCAGT GCCACCAATG CCAGACTGGT AGGTGAACCC AACACGGGAC CTCCAACGGT

1022  
 AGCTGTTTCGG TAAGGTCCTG GAGGAGAGAA ACCTGCTGAC CATGCCTCCA TCCCACCTGT  
 TCGACAAGCC ATTCCAGGAC CTCCTCTCTT TGGACGACTG GTACGGAGGT AGGGTGGACA\*

GAG  
 CTCAGCT  
 \*\*SalI

Fig.14A. (その1)



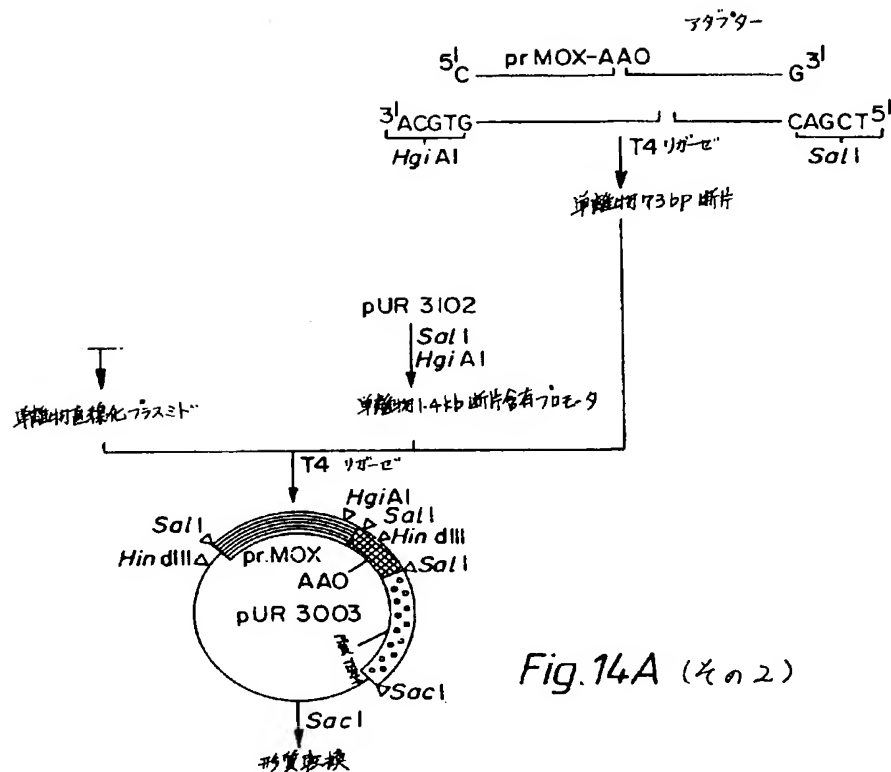


Fig. 14A (その2)

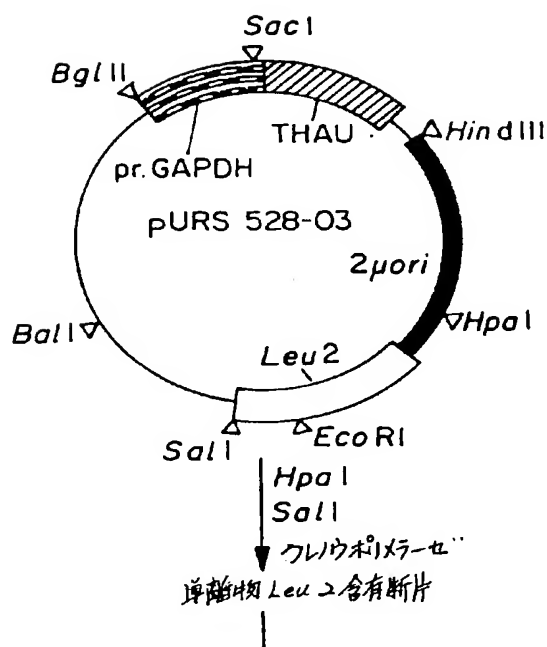
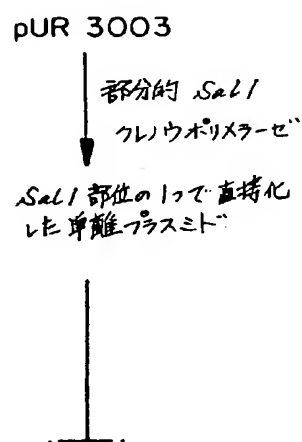


Fig. 14B. (その1)



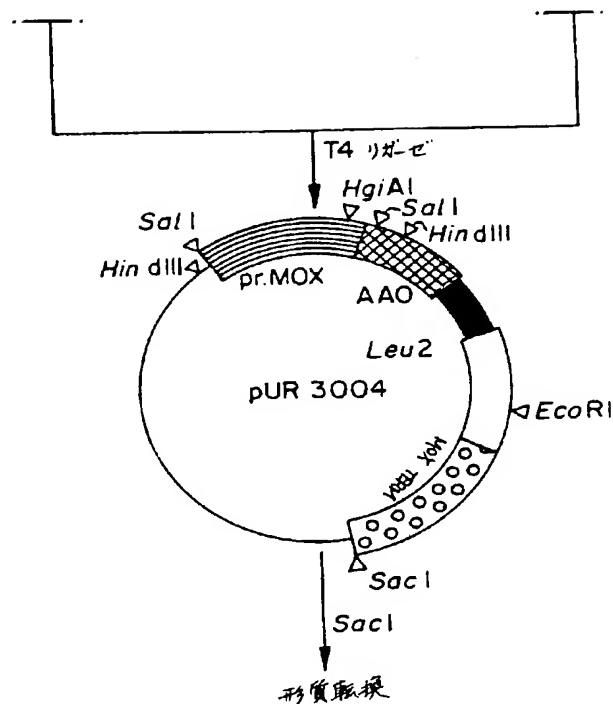
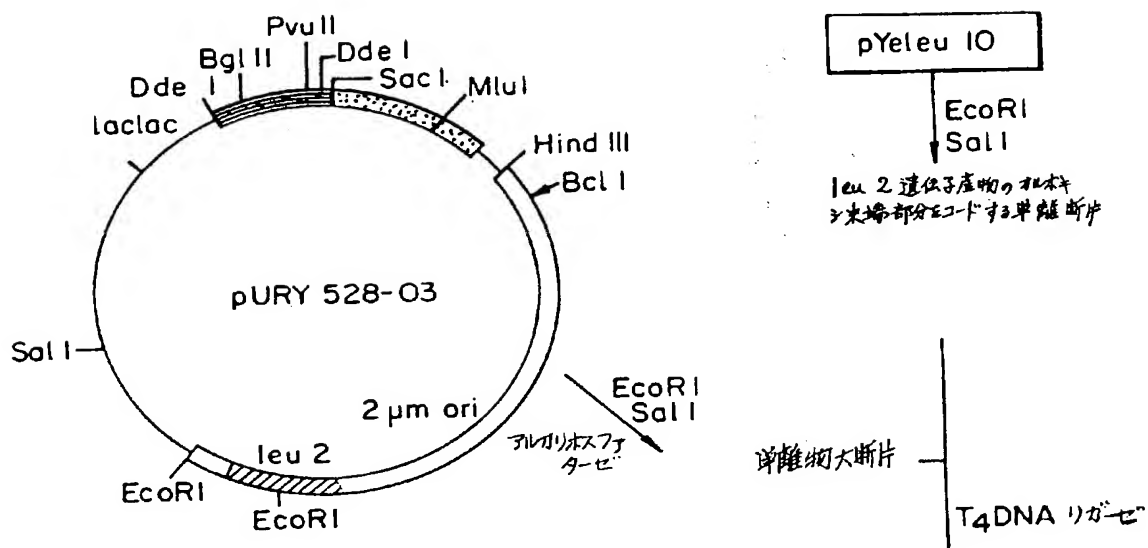


Fig.14B (その2)

Fig.14C. (その1)





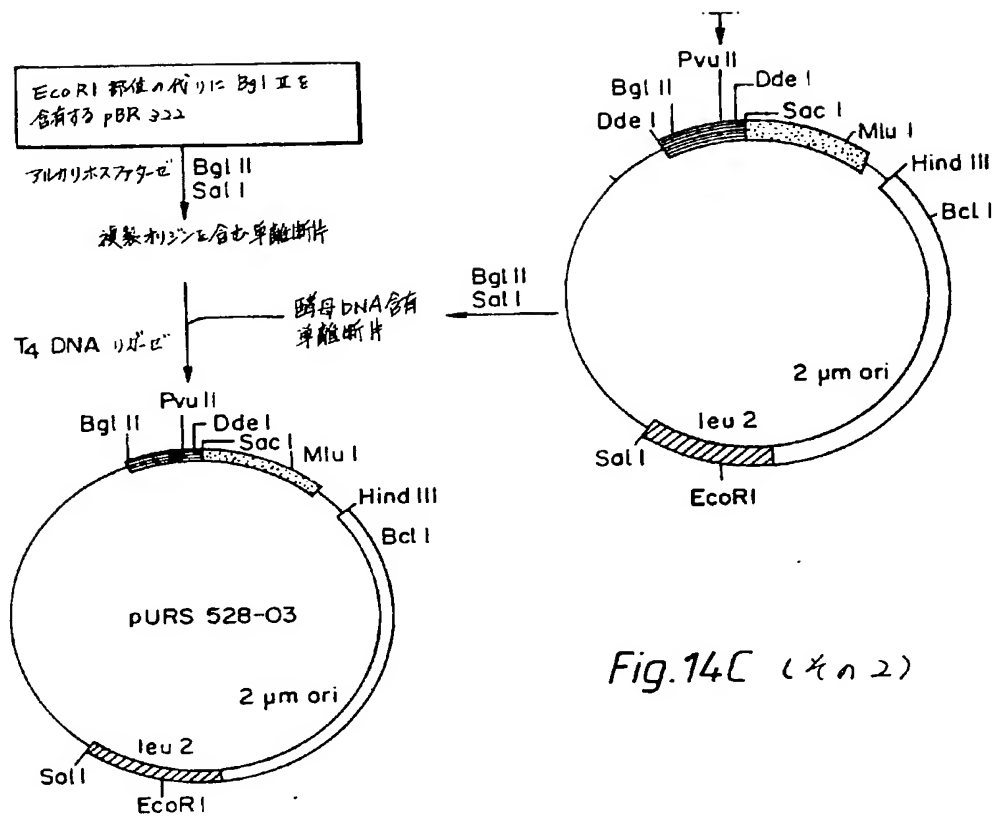


Fig.14C (その2)

Fig.15.

<----- プロモータ MOX-HGRF タグター ----->  
 -34  
 CGGTG GTGACATCAA TCTAAAGTA CAAAAACAAA  
 ACGTGCCAC CACTGTAGTT AGATTTTCAT GTTTTTGTTT  
 HgtAI

<----->  
 1  
 ATGTACGCCG ACGCCATCTT CACCAACTCC TACAGAAAGG TTCTGGGTCA GCTCTCGGCC  
 TACATGCGGC TCGGTAGAA GTGGTTGAGG ATGTCTTTCC AAGACCCAGT CGAGAGCCGG  
 Met

-->  
 61  
 AGAAAGCTTC TGCAGGACAT CATGTCGAGA CAGCAGGGTG AGTCCAACCA GGAGAGAGGT  
 TCTTTTGAAG ACGTCCTGTA GTACAGCTCT GTCGTCCCAC TCAGGTTGGT CCTCTCTCCA  
 HindIII Pst I

121  
 GCCAGAGCCA GACTGTGAG  
 CGGTCTCGGT CTGACACTCA GCT  
 \*\*\* SalI

Fig.16A. (Xの1)

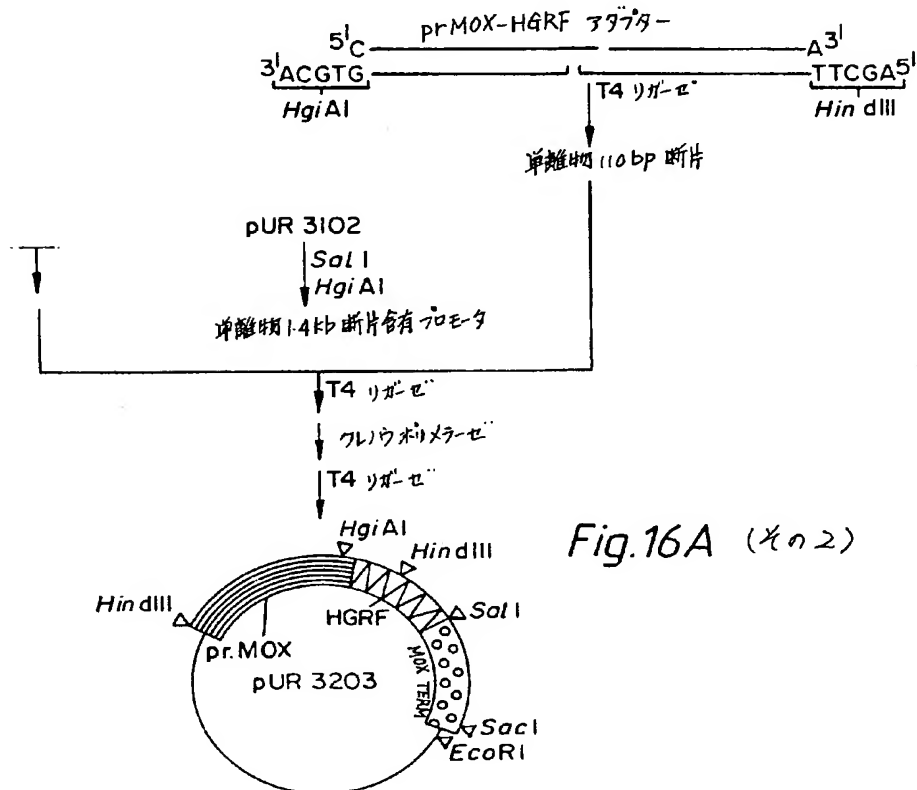
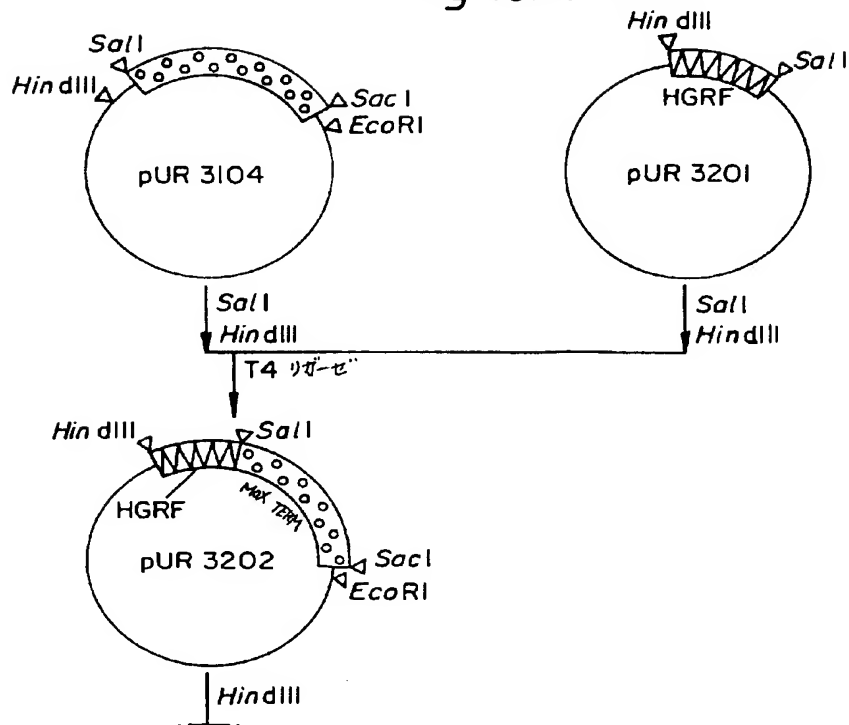


Fig.16A (Xの2)

Fig. 16C.

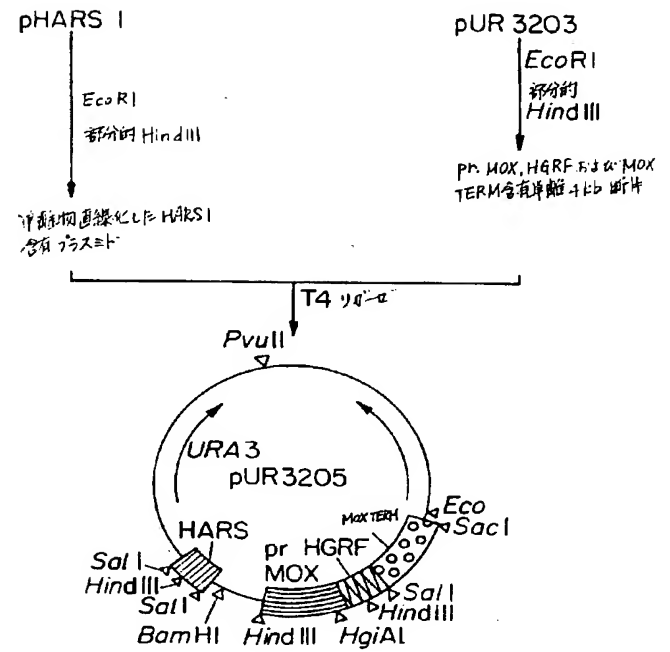
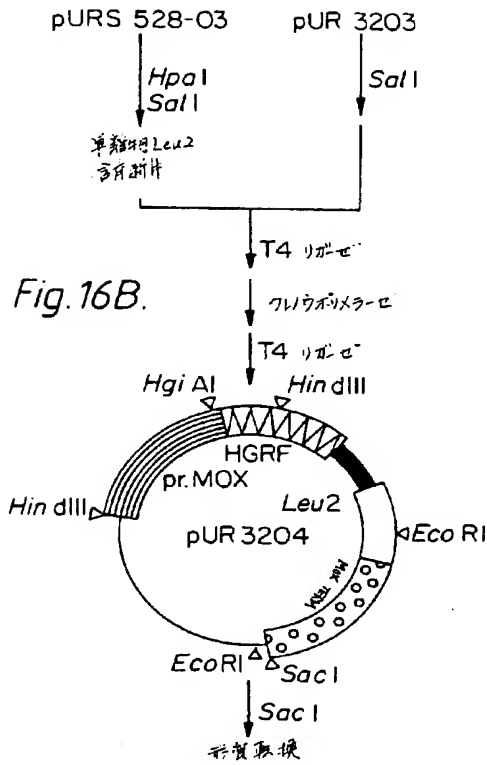


Fig. 16D. (その1)

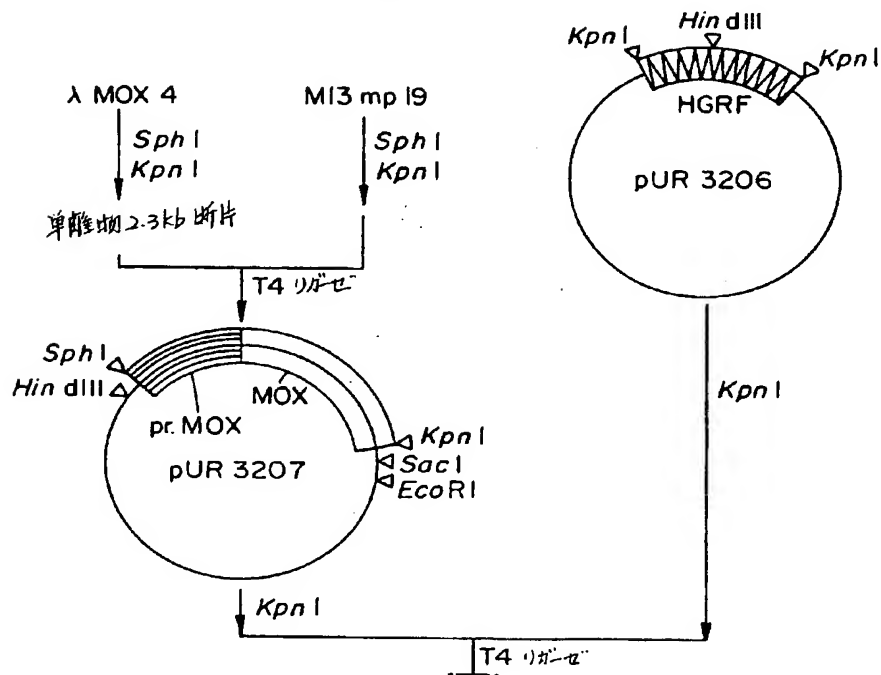


Fig.16E.

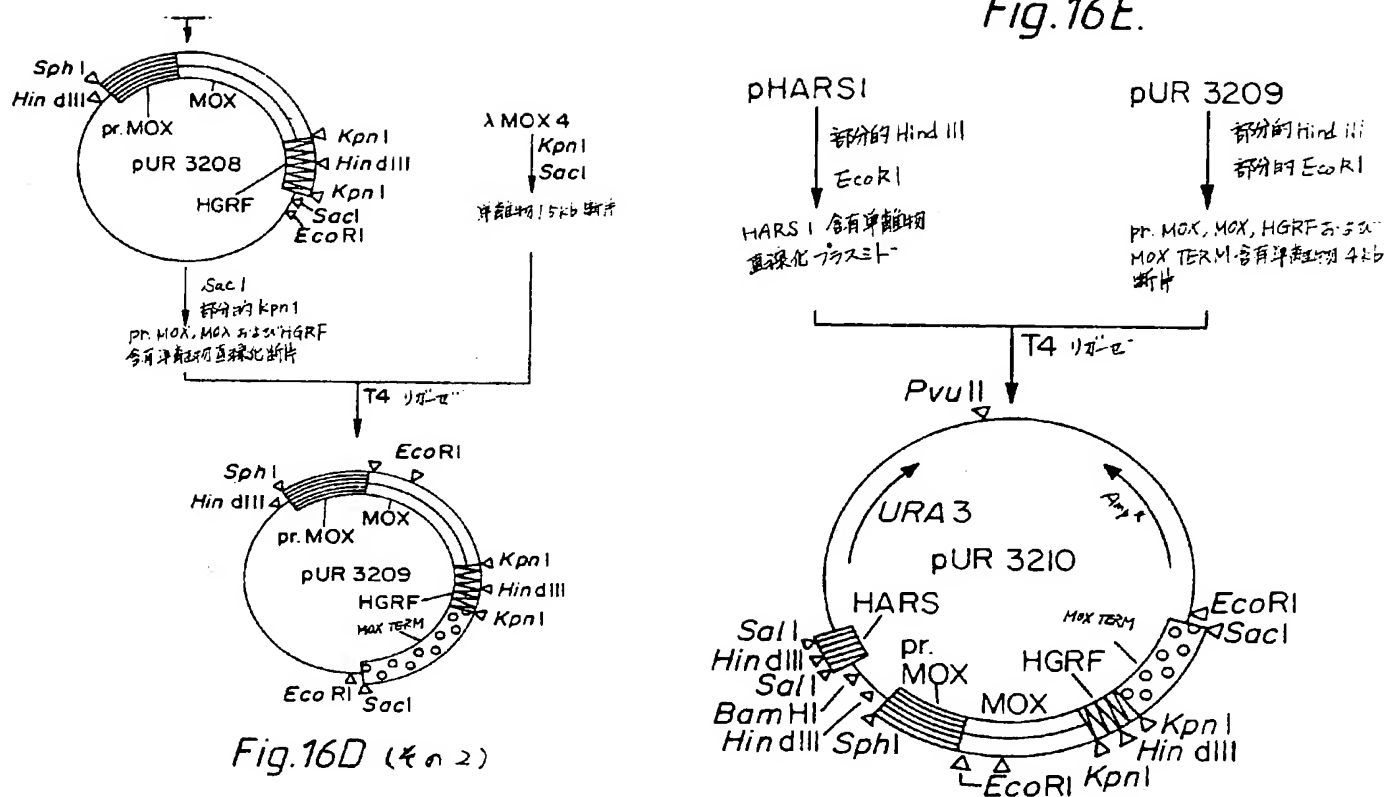


Fig.16D (その2)

Fig.16F.

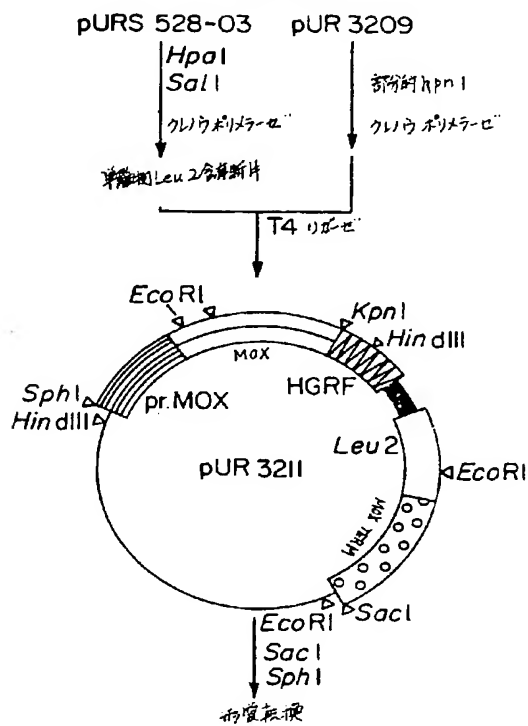


Fig. 17.

1  
 CATGTACGCCG ACGCCATCTT CACCAACTCC TACAGAAAGG TTCTGGGTCA GCTCTCGGCC  
 CATGGTACATGCGGC TCGGGTAGAA GTGGTTGAGG ATGTCTTTCC AAGACCCAGT CGAGAGCCGG  
KpnI Met

61  
 AGAAAGCTTC TGCAGGACAT CTGTTGAGA CAGCAGGGTG AGTCCAACCA GGAGAGAGGT  
 TCTTTCGAAG ACGTCCTGTA GACAAGCTCT GTCGTCCAC TCAGGTTGGT CCTCTCTCCA  
HindIII PstI cys

121  
 GCCAGAGCCA GACTGTGAGGTAC  
 CGGTCTCGGT CTGACACTC  
 \*\*\* KpnI

Fig. 18A. (その1)

CTTGGCCAAT GATTGAGCTG CTGGACCGAA AACGCCTCTT TTGGCCAAAA AAAGCCCACC  
 -2104  
 GTTGATAACT GCGGAGGCCA TATTTCAAAG AACAGCGAAT AAGAAAAAAA GGTGAATGAA  
 -2054 -2004  
 ATGCGCGAAA CGATACCACT TATTAGCATA AACAAAAAAA AAAAAAATCT ATTAGCTGTT  
 -1954  
 ATTATAATTA GTTCAATAAT TTCATAAGCA TCATGGTTGG GCGGCCTATT GTCATCAGTG  
 -1904  
 GTCCCTCTGG AACAGGTAAA TCCACTTTGC TGAAGAAGCT GTTTGCTGAG TTCCAGACA  
 -1854  
 AGTTTGGATT TTCCGTGTCC AACACCACGA GAAAACCTAG ACCTGGTGAA AAAGACGGTG  
 -1804  
 TCGATTACCA CTTCAACCACG GTAGAGGACT TCAAGAAGAT GATTGAAGAA AACAAATTCA  
 -1754 -1704  
 TTGAATGGGC CCAGTTCTCC GGCAACTACT ACGGCACCTC TGTGAAAGCT GTGCAAGACG  
 -1654  
 TGGCCGAAGT GATGAAGAGA ACCTGTATTT TGGACATTGA TATGCAGGGT GTCAAGAGCG  
 -1604  
 TCAAGAAGAC CAACCTGGGA GCCCGATTCC TCTTTATTTT TCCTCCGTCC ATCGAAGAGC  
 -1554  
 TCAAGAAGAG GCTCGAGAGC CGTGGAACAG AGACCCCTGA ATCTCTTGCC AAGCGGCTTG  
 -1504  
 CTGCTGCATC TCGGAGATG GAGTACGCCA GGGCAGTGGG CACGACAAGG TCATTGTCAA  
 -1454 -1404  
 CGATGACCTT GAGAAGGCGT ACTCTGAGCT GAAGGAGTTC ATTTTCGCCG AGCCCATCTA  
 -1354  
 AGCATTGATA AATTTTTAAT ATCTAGAGCT CTCATACGGG ACAGTATCTC CTCCAACCTT  
 -1304

Fig. 18A. (No. 2)

GCGTCAAGCT TGTCTCTTC ATGCTCCTCA ACAGTCATGG CATCCAGCTG CTGCTGCTTT  
 -1254  
 TGCTCCAGCC TGGCATATAT GTCGCCATAC AGCTTGAGTT GGATTTTGAT GAAACTCTCA  
 -1204  
 AAGGTAGGGT CCACCAGTGA CAGTCGCAGC CCAATGAACT GCTCGATTTT GTTCTTGAGC  
 -1154 -1104  
 CGTGTGTTGA TGTCCGTGTA GATATTTTCT GCCTCGTCGT ACTCAACTTT GAACTTCTGC  
 -1054  
 AGCTTGTTCCA GGCTCTTCTG TAACTGGTCT GTTTTCTCGG TGTGATGCTG CTCGGTCACC  
 -1004  
 TGTCGCTCAA TCGCTTCGTA CTCGCTCTGC AGCTTCGAAA GCTTGAATCG TGAAACGTCG  
 -954  
 TAATCCACCT TTTTGCGTGC GCGCTTCTTG ATCAGCTTGT TGATCTCGTC GTTGTACTTC  
 -904  
 TTCAGCTCGT TAATCGGCTC CACGACCGTG ATGCTCATTG GCTCCAGAAT TTCTGGCAGA  
 -854 -804  
 ATATTGTCTT TGATGTCTTC CACCATCTGC AGATAATTCA CAGAAATACC ATCTCTGGGG  
 -754  
 TTCACCTTGT GCTCTTCTGG CCGTTCCGCA GCTTCCGACC GCTTATCAGC CTTGAGCTCA  
 -704  
 AAGCTATAGT CTCCGTAAAA CGAGTCCAGT GTTCTAGCCA TATTTATCTG AGTCTCGAGC  
 -654  
 AGATTCTCCG AAATTGCCCA CAAAACGGCC TAGTTCCTGG TCCAGCTCGT TGGTGTAAGT  
 -604  
 CTCGAGTTTG CGGAAATTGG CCTCCTGGAC GTCAAACCTCA GGATCAACAG AGGGCTCACC  
 -554 -504  
 TTTGTTTGTG CGTAGTATCA CATGTGCTCC GGCACGATTG ACAGCTTTTT TAAACCCAAC  
 -454

Fig. 18A. (No. 3)

CCATGACATG TCGAGGAAAG GGTCGTTTCG GGGAGTTAAA TATTTTTGGC TATGTAGCAC  
 -404  
 ACATGTTTCG ACGCTGGCGT CGCGTCGATC GGAAAATATT ACCCCAGGAA CAAGCACTTC  
 -354  
 CTTGGGTTAG CCACCACCCT GCGCAAGCCT TTTTGCCGGC TCTACACAGG GCCAATGAAA  
 -304  
 TCTGGGCGGA ATCTGAAACC GATGAAACGG ACGACACTGG CAACAAGCTC ACTGCACTAT  
 -254 -204

Fig. 18B. (その1)

TTTTTTTTTC TAGTGAATA GCCTATCCTC GTCTCGCTCC CCTCATACCT GTAAAGGGGT  
 ~154  
 GCAATTTAGC CTCGTTCCAG CCATTCACGG GCCACTCAAC AACACGTCGG CTACCATGGG  
 ~104  
 GTGCTTGGGC ACCAAAAGGC CTATAAATAG GCCCCCATCC GTCTGCTACA CAGTCATCTC  
 ~54  
 1 5 10 15  
 TGTCTTTTCTTCCC ATG AGT ATG AGA ATC CCT AAA GCA GCG TCG GTC AAC GAC GAA CAA CAC  
 14 20 25 30 35  
 GLN ARG ILE ILE LYS TYR GLY ARG ALA LEU VAL LEU ASP ILE VAL GLU GLN TYR GLY GLY  
 CAG AGA ATC ATC AAG TAC GGT CGT GCT CTT GTC CTG GAC ATT GTC GAG CAG TAC GGA GGA  
 40 45 50 55  
 GLY HIS PRO GLY SER ALA MET GLY ALA MET ALA ILE GLY ILE ALA LEU TRP LYS TYR THR  
 GGC CAC CCG GGC TCG GCC ATG CGC GCC ATG GCT ATC GGA ATT GCT CTG TGG AAA TAC ACC  
 60 65 70 75  
 LEU LYS TYR ALA PRO ASN ASP PRO ASN TYR PHE ASN ARG ASP ARG PHE VAL LEU SER ASN  
 CTG AAA TAT GCT CCC AAC GAC CCT AAC TAC TTC AAC AGA GAC AGG TTT GTC CTG TCG AAC  
 80 85 90 95  
 GLY HIS VAL CYS LEU PHE GLN TYR ILE PHE GLN HIS LEU TYR GLY LEU LYS SER MET THR

Fig. 18B. (その2)

GGT CAC GTG TGT CTG TTC CAG TAT ATC TTC CAG CAC CTG TAC GGT CTC AAG TCG ATG ACC  
 100 105 110 115  
 MET ALA GLN LEU LYS SER TYR HIS SER ASN ASP PHE HIS SER LEU CYS PRO GLY HIS PRO  
 ATG GCC CAG CTG AAG TCC TAC CAC TCG AAT GAC TTC CAC TCG CTG TGT CCC GGT CAC CCA  
 120 125 130 135  
 GLU ILE GLU HIS ASP ALA VAL GLU VAL THR THR GLY PRO LEU GLY GLN GLY ILE SER ASN  
 GAA ATC GAG CAC GAC GCC GTC GAG GTC ACA ACG GGC CCG CTC GGC CAG GGT ATC TCG AAC  
 140 145 150 155  
 SER VAL GLY LEU ALA ILE ALA THR LYS ASN LEU ALA ALA THR TYR ASN LYS PRO GLY PHE  
 TCT GTT GGT CTG GCC ATA GCC ACC AAA AAC CTG GCT GCC ACG TAC AAC AAG CCG GGC TTT  
 160 165 170 175  
 ASP ILE ILE THR ASN LYS VAL TYR CYS MET VAL GLY ASP ALA CYS LEU GLN GLU GLY PRO  
 GAT ATC ATC ACC AAC AAG GTG TAC TGC ATG GTT GGC GAT GCG TGC TTG CAG GAG GGC CCT  
 180 185 190 195  
 ALA LEU GLU SER ILE SER LEU ALA GLY HIS MET GLY LEU ASP ASN LEU ILE VAL LEU TYR  
 GCT CTC GAG TCG ATC TCG CTG GCC GGC CAC ATG GGG CTG GAC AAT CTG ATT GTG CTC TAC  
 200 205 210 215  
 ASP ASN ASN GLN VAL CYS CYS ASP GLY SER VAL ASP ILE ALA ASN THR GLU ASP ILE SER  
 CAC AAC AAC CAG GTC TGC TGT GAC GGC AGT GTT GAC ATT GCC AAC ACG GAG GAC ATC AGT  
 220 225 230 235  
 ALA LYS PHE LYS ALA CYS ASN TRP ASN VAL ILE GLU VAL GLU ASN ALA SER GLU ASP VAL  
 GCC AAG TTC AAG GCC TGC AAC TGG AAC GTG ATC GAG GTC CAG AAC GCT TCC GAG GAC GTG  
 240 245 250 255  
 ALA THR ILE VAL LYS ALA LEU GLU TYR ALA GLN ALA GLU LYS HIS ARG PRO THR LEU ILE  
 GCT ACC ATT GTC AAG GCC TTG GAC TAC GCG CAG GCC GAG AAG CAC AGA CCA ACA CTT ATC  
 260 265 270 275  
 ASN CYS ARG THR VAL ILE GLY SER GLY ALA ALA PHE GLU ASN HIS CYS ALA ALA HIS GLY  
 AAC TCC AGA ACT GTG ATT GGA TCG CGT GCT GCG TTC GAG AAC CAC TGT GCT GCG CAC GGT

Fig.18B. (No 3)

ASN	ALA	LEU	GLY	GLU	ASP	GLY	VAL	280	ARG	GLU	LEU	LYS	ILE	285	LYS	TYR	GLY	MET	ASN	PRO	ALA	290	295
AAC	GCT	CTG	GGC	GAG	GAC	GGT	GTG	300	CGC	GAG	CTC	AAA	ATC	305	AAG	TAC	GGC	ATG	AAC	CCG	GCC	310	315
GLN	LYS	PHE	TYR	ILE	PRO	GLN	ASP	320	VAL	TYR	ASP	PHE	PHE	325	LYS	GLU	LYS	PRO	ALA	GLU	GLY	330	335
CAG	AAG	TTC	TAC	ATT	CCG	CAG	GAC	340	GTG	TAC	GAC	TTC	TTC	345	AAG	GAG	AAG	CCG	GCC	GAG	GCC	350	355
ASP	LYS	LEU	VAL	ALA	GLU	TRP	LYS	360	SER	LEU	VAL	ALA	LYS	365	TYR	VAL	LYS	ALA	TYR	PRO	GLU	370	375
GAC	AAG	CTG	GTG	GCC	GAA	TGG	AAG		AGT	CTC	GTG	GCC	AAG		TAC	GTC	AAG	GCG	TAC	CCT	GAG		
GLU	GLY	GLN	GLU	PHE	LEU	ALA	ARG		MET	ARG	GLY	GLU	LEU		PRO	LYS	ASN	TRP	LYS	SER	PHE		
GAG	GGC	CAG	GAG	TTT	TTG	GCG	CGG		ATC	AGA	GGC	GAG	CTG		CCA	AAG	AAC	TGG	AAG	TCC	TTC		

Fig.18C. (No 1)

LEU	PRO	GLN	GLN	GLU	PHE	THR	GLY	ASP	ALA	PRO	THR	ARG	ALA	ALA	ALA	ARG	GLU	LEU	VAL		
CTG	CCG	CAG	CAG	GAA	TTC	ACC	GGC	GAC	GCT	CCT	ACA	AGG	GCC	GCT	GCC	AGA	GAG	CTT	GTG		
ARG	ALA	LEU	GLY	GLN	ASN	CYS	LYS	SER	VAL	ILE	ALA	GLY	CYS	ALA	ASP	LEU	SER	VAL	SER		
AGA	GCC	CTG	GGG	CAG	AAC	TGC	AAG	TCG	GTG	ATT	GCC	GGT	TGC	GCA	GAC	CTG	TCT	GTG	TCT		
VAL	ASN	LEU	GLN	TRP	PRO	GLY	VAL	LYS	TYR	PHE	MET	ASP	PRO	SER	LEU	SER	THR	GLN	CYS		
GTC	AAT	TTG	CAG	TGG	CCA	GGG	GTG	AAA	TAT	TTC	ATG	GAC	CCC	TCG	CTG	TCC	ACG	CAG	TGT		
GLY	LEU	SER	GLY	ASP	TYR	SER	GLY	ARG	TYR	ILE	GLU	TYR	GLY	ILE	ARG	GLU	HIS	ALA	MET		
GCC	CTG	AGC	GGC	GAC	TAC	TCC	GGC	AGA	TAC	ATT	GAG	TAC	GGA	ATC	AGA	GAA	CAC	GCC	ATG		
CYS	ALA	ILE	ALA	ASN	GLY	LEU	ALA	ALA	TYR	ASN	LYS	GLY	THR	PHE	LEU	PRO	ILE	THR	SER		
TGT	GCT	ATC	GCC	AAT	GGC	CTT	GCC	GCC	TAC	AAC	AAG	GGC	ACG	TTC	CTG	CCG	ATC	ACC	TCC		
THR	PHE	PHE	MET	PHE	TYR	LEU	TYR	ALA	ALA	PRO	ALA	ILE	ARG	MET	ALA	GLY	LEU	CLN	GLU		



Fig.18C. (その2)

```

ACT TTC TTC ATG TTC TAC CTG TAC GCT GCC CCA GCC ATC AGA ATG GCC GGC CTG CAG GAG
480 485 490 495
LEU LYS ALA ILE HIS ILE GLY THR HIS ASP SER ILE ASN GLU GLY GLU ASN GLY PRO THR
CTC AAG GCG ATC CAC ATC GGC ACC CAC GAC TCG ATC AAT GAG GGT GAG AAC GGC CCT ACG
500 505 510 515
HIS GLN PRO VAL GLU SER PRO ALA LEU PHE ARG ALA TYR ALA ASN ILE TYR TYR MET ARG
CAC CAG CCG GTC GAG TCG CCA GCA TTG TTC CGG GCC TAT GCA AAC ATT TAC TAC ATG AGA
520 525 530 535
PRO VAL ASP SER ALA GLU VAL PHE GLY LEU PHE GLN LYS ALA VAL GLU LEU PRO PHE SER
CCG GTC GAC TCT GCA GAA GTG TTT GGC CTG TTC CAA AAA ALA GGC GTC GAG CTG CCA TTC AGC
540 545 550 555
SER ILE LEU SER LEU SER ARG ASN GLU VAL LEU GLN TYR LEU ALA SER ARG ALA GLN ARG
TCG ATT CTG TCG CTC TCG AGA AAC GAG GTG CTG CAA TAC CTG GCA AGT CGA GCG CAG AGA
560 565 570 575
ARG ARG ASN ALA ALA GLY TYR ILE LEU GLU ASP ALA GLU ASN ALA GLU VAL GLN ILE ILE
AGG CGC AAC GCG GCC GGC TAT ATT CTG GAG GAT GCG GAG AAC GCC GAG GTG CAG ATT ATT
580 585 590 595
GLY VAL GLY ALA GLU MET GLU PHE ALA ASP LYS ALA ALA LYS ILE LEU GLY ARG LYS PHE
GGA GTT GGT GCA GAG ATG GAG TTT GCA GAC AAG GCC GCC AAG ATC TTG GGC AGA AAG TTC
600 605 610 615
ARG THR ARG VAL LEU SER ILE PRO CYS THR ARG LEU PHE ASP GLU GLN SER ILE GLY TYR
AGG ACC AGA GTT CTC TCC ATC CCA TGC ACG CGG CTG TTT GAC GAG CAG TCG ATC GGC TAT
620 625 630 635
ARG ARG SER VAL LEU ARG LYS ASP GLY ARG GLN VAL PRO THR VAL VAL VAL ASP GLY HIS
AGA CGC TCG GTT TTG AGA AAG GAC GGC AGA CAG GTG CCA ACG GTG GTG GTG GAC GGC CAC
640 645 650 655
VAL ALA PHE GLY TRP GLU ARG TYR ALA THR ALA SER TYR CYS MET ASN THR TYR GLY LYS
CTT GCG TTC GGC TGG GAG AGA TAC GCT ACG GCG TCC TAC TGT ATG AAC ACG TAC GGC AAG

```

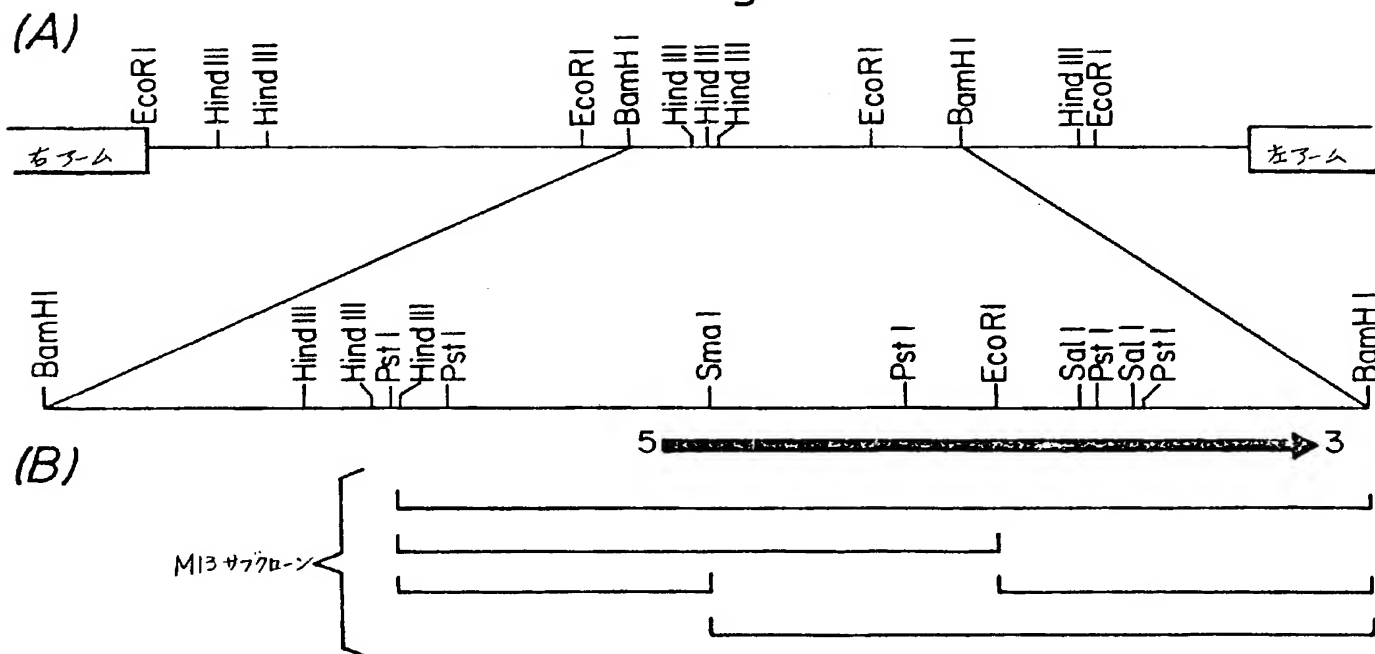
Fig.18C. (その3)

```

660 665 670 675
SER LEU PRO PRO GLU VAL ILE TYR GLU TYR PHE GLY TYR ASN PRO ALA THR ILE ALA LYS
TCT CTG CCT CCA GAA GTG ATC TAC GAG TAC TTT GGA TAC AAC CCG GCA ACG ATT GCC AAG
680 685 690 695
LYS VAL GLU ALA TYR VAL ARG ALA CYS GLN ARG ASP PRO LEU LEU LEU HIS ARG LEU PRO
AAG GTC GAA GCG TAC GTC CGG GCG TGC CAA AGA GAC CCT TTG CTG CTC CAC CGA CTT CCT
700
GLY PRO GLU GLY LYS ALA ***
GGA CCT GAA GGA AAA GCC TAA CCACGAT AAAGTAAATA AGCTCTGATT AAGTAAGATG
2110
AATAAGTTCT TTGTCTGTGA ATGCCACCCC ACAATAACCC CACAAATAAA ACTTTTCACAC
2160 2210
TTGCGTCAGA AACTGTGCGAG CCGCACGGGA CTGACTGTTT GCCGCCGTGC CTCTGTCCCC
2260
ACACGGATAT TTCGCACGGA ACAGAAACCA TTGGACAAGG GGTGCTGCC GATACCAAAT
2310
AGAATGCATC GGATCC
2350

```

Fig.19.



第 1 頁の続き

⑥ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

C 12 N 9/02  
 9/06  
 15/00  
 21/00  
 C 12 P  
 // (C 12 N 9/04  
 (C 12 R 1:66)  
 (C 12 N 9/04  
 (C 12 R 1:72)  
 (C 12 N 9/04  
 (C 12 R 1:84)  
 (C 12 N 9/04  
 (C 12 R 1:78)  
 (C 12 N 9/04  
 (C 12 R 1:85)  
 (C 12 N 9/04  
 (C 12 R 1:88)  
 (C 12 N 9/04  
 (C 12 R 1:645)  
 (C 12 N 1/14  
 (C 12 R 1:66)  
 (C 12 N 1/14  
 (C 12 R 1:645)  
 (C 12 N 1/16  
 (C 12 R 1:72)  
 (C 12 N 1/16  
 (C 12 R 1:78)  
 (C 12 N 1/16  
 C 12 R 1:85)

7236-4B  
 7236-4B  
 7115-4B  
 7235-4B

優先権主張

②1985年2月7日③イギリス(GB)④8503160

⑦発明者	クリスチアン ビザー	オランダ国カペル ア/ド イユセル ミノエセルフ 77
⑦発明者	ツビグニエブ アロイ	ドイツ連邦共和国エルクラト・ウンテルフェルトハウス,
	ツイ ヤノウイクツ	アダルベルト・シュティフテル・シュトラッセ 49
⑦発明者	コルネリス ペトルス	ドイツ連邦共和国デュッセルドルフ, ショパン・シュトラ
	ホレンベルグ	ーセ 7

# 手続補正書

昭和60年10月30日

- (1) 第3図を添付図面第3図と差し換える。  
(2) 第20図を加入する。

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

昭和60年特許第166622号

## 2. 発明の名称

オキシドリダクターゼの製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

氏 名

(名 姓)

ユニリーバー ナームローゼ  
ベンノートシャープ

## 4. 代 理 人

居 所

氏 名

〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビルディング331  
電 話 (211) 3 6 5 1 (代 表)  
(6669) 浅 村

## 5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

## 6. 補正により増加する発明の数

## 7. 補正の対象

図 面

## 8. 補正の内容 別紙のとおり



2  
 ↑  
 (G)TCGACTCCC GCGACTCGGC GTTCACTTTC GAGCTATTAT 40  
 CAACGCCGGA ATACGTCAGA AACAGCCGTG CCCAGGGAC 80  
 CAGAAAGCCT ACTGGTGAGT ATGTTCTTTC GTGTGATTTT 120  
 TCCGAGGATG AGAACGACGA TAACGAGCAC AACTCGGAGT 160  
 CGGAGGACAC GCTTATTGCG TTGAACGCAG CCACATCAGC 200  
 AGGCTGTCAA GACTGAGTAT GGCCACAGAG CTGGATTCTC 240  
 GGCCTCAATAC TCAAGACGTT AGTAAACTCC GTCTGCCAGA 280  
 AATTGCTGAC GAGGATGTAT AATAATAGAT GAATTACGAA 320  
 CAATTGTAGT TCAAAAAAAT TTAGTAACAA TATTGTCTAG 360  
 ATGACAGATG TGCTGAAACC AGTGA ACTCC AATAAACCAC 400  
 TCACCGCTAC CCAAGAGAAA CAGATCAGAG TGCTAGGGCC 440  
 TTGTTTCAGA GTACTACAAC GTTTACCAGA AGCTTGAGCA 480  
 AGTTCTCAA CGCGGGTTTG (TCGAC)  
 ↓  
 500

Fig. 3.

Fig. 20.

DAS -1076

TAGATATTTTCTGCCTCGTCGTACTCA-54N-GTGTGATG-8N-TCACC-9N-  
 \* \* \* \* \*

\* \* \* \* \*

TCGAAATTTTGGCCGTCGTCGTACAGTGTGATGTCACC

MOX -1052

DAS

-937

ATCGCTTCGTACTCGCTCTGCAGCTTCGA

\* \* \* \* \*

\* \* \* \* \*

ATCGAATGTAATGAGCTGCAGCTTGCGA

MOX

-987

手 続 補 正 書 (方 式)

昭和60年11月20日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第166622号

2. 発明の名称

オキシドリダクターゼの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

氏 名 ユニバー テムローゼ ベントトシャーフ

4. 代 理 人

居 所

〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新 大 手 町 ビ ル デ ン グ 3 3 1

電 話 (211) 3 6 5 1 (代 表)

氏 名

(6669) 浅 村

皓

5. 補正命令の日付

昭和60年10月29日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

図 面

明 細 書

6011.20

8. 補正の内容 別紙のとおり

図面の添削 (内容に変更なし)

明細書の添削 (内容に変更なし)

昭 63. 4. 19 発行

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

1-60-166622

昭和 60 年特許願第 166622 号(特開 昭 61- 92569 号, 昭和 61 年 5 月 10 日 発行 公開特許公報 61- 926 号掲載)については特許法第17条の2の規定による補正があったので下記のとおり掲載する。 1 ( 1 )

Int. Cl. '4	識別記号	庁内整理番号
C12N 9/04		7823-4B
1/14		6712-4B
1/16		5712-4B
9/02		7823-4B
9/06		7823-4B
15/00		8412-4B
C12P 21/00		6712-4B
// ( C12N 9/04		
C12R 1:66 )		
( C12N 9/04		
C12R 1:72 )		
( C12N 9/04		
C12R 1:84 )		
( C12N 9/04		
C12R 1:78 )		
( C12N 9/04		
C12R 1:85 )		

(続きあり)

Int. Cl. '4	識別記号	庁内整理番号
( C12N 9/04		
C12R 1:88 )		
( C12N 9/04		
C12R 1:645 )		
( C12N 1/14		
C12R 1:66 )		
( C12N 1/14		
C12R 1:545 )		
( C12N 1/16		
C12R 1:72 )		
( C12N 1/16		
C12R 1:78 )		
( C12N 1/16		
C12R 1:85 )		

## 手 続 補 正 書

昭和 63 年 1 月 22 日

特許庁長官殿

### 1. 事件の表示

昭和 60 年特許願第 166622 号

### 2. 発明の名称

オキシドリダクターゼの製造法

### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 ユニリーパー ナームローゼ ペンノートシャープ  
氏 名 (名 称)

### 4. 代 理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号  
新 大 手 町 ビ ル デ ィ ング 3 3 1  
電 話 (211) 3 6 5 1 (代 表)  
氏 名 (6669) 浅 村

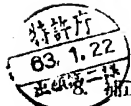
### 5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

### 6. 補正により増減する発明の数 1

### 7. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄



補正の内容 別紙のとおり

### 9. 添付書類の目録 同時に出願審査請求書を提出してあります。

(1) 特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

(特許請求の範囲第7項を削除する。)

## 2. 特許請求の範囲

(1) 適当な条件下で微生物を培養し、任意には生成した酵素を濃縮しついでこの濃縮酵素を公知方法により集取してオキシドリダクターゼを製造する方法において、組換え DNA 技術により得、そしてオキシドリダクターゼを産生しうる微生物を使用することを特徴とする、上記方法。

(2) 微生物は

- 1) アルコールオキシダーゼ
- 2) アルキルアミンオキシダーゼおよびベンジルアミンオキシダーゼを含むアミンオキシダーゼ、
- 3) D-アラニンオキシダーゼ、リジンオキシダーゼを含むアミノ酸オキシダーゼ、
- 4) コレステロールオキシダーゼ、
- 5) 尿酸オキシダーゼ、
- 6) キサンチンオキシダーゼ、

(6) 微生物はジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素を産生することができ、ホルムアルデヒドからジヒドロキシアセトンの生成を促進する酵素を産生する、特許請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載の方法。

~~(7) 特許請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載の方法により得たオキシドリダクターゼを酸化方法に使用すること。~~

(7) 漂白活性を有する洗剤組成物又は硬質面洗浄組成物を含む漂白組成物であつて、特許請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載の方法により得たオキシドリダクターゼおよびその基質を含有することを特徴とする、上記組成物。

(8) 組換え DNA 技術により製造でき、かつ特許請求の範囲第1項から第5項のいずれか1項に記載の方法に使用するのに適したオキシドリダクターゼを産生しうる、微生物。

(9) 組換え DNA 技術により製造でき、かつ特許請求の範囲第6項記載の方法に使用するのに適したジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素を産生し得、

7) クロロパーオキシダーゼ、および

8) アルデヒドオキシダーゼ

から成る群から選択した少なくとも1種の酵素を産生しうる、特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) 微生物はカビ又は酵母である、特許請求の範囲第1項又は第2項記載の方法。

(4) カビ又は酵母はアスペルギルス属、カンジダ属、ゲオトリカム属、ハンセヌラ属、レンジト属、ナドソニア属、ピチア属、ボリア属、ポリボラス属、サツカロミセス属、スポロ<sup>ホ</sup>ロミセス属、トルロプシス属、トリコスボラ属およびゼンデラ属から成る群から選択する、特許請求の範囲第3項記載の方法。

(5) カビ又は酵母はアスペルギルス・ジャポニカス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリゼ、カンジダ・ボイジニ、ハンセヌラ・アノマラ、ハンセヌラ・ポリモーフア、ハンセヌラ・ウインゲイ、クローケラ・sp. 2201 およびピチア・パストリス種から選択する、特許請求の範囲第4項記載の方法。

さらにオキシドリダクターゼを産生し得る、微生物。

(10) 特許請求の範囲第9項記載の形質転換微生物の調製方法において、構造遺伝子の発現を調節する1種以上の他の DNA 配列と共にオキシドリダクターゼをコードする DNA 配列をエピソードベクターを介して微生物に導入するか又はゲノムにて統合させて、微生物をオキシドリダクターゼ産生可能にさせることを特徴とする、上記方法。

(11) 特許請求の範囲第10項記載の形質転換微生物の調製方法において、構造遺伝子の発現を調節する1種以上の別の DNA 配列と共にジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素をコードする DNA をエピソードベクター又はゲノム中の統合を介して導入し、微生物をジヒドロキシアセトンシンターゼ酵素 (DHAS 酵素) を産生させ得ることを特徴とする、上記方法。

(12) 天然の DNA および/又は cDNA および/又は化学的に合成した DNA から組換え DNA 技術により得ることができることを特徴とする、オキシドリ

ダクターゼをコードする DNA 配列。

(13) アルコールオキシダーゼをコードする、特許請求の範囲第 1 3 項記載の DNA 配列。

(14) ポリペプチド 1 - 6 6 4 (MOX) をコードする第 1 1 A + 1 1 B に示した DNA 配列 1 - 1 9 9 2 (MOX 遺伝子) を有し、そのアミノ酸配列は第 1 1 A + 1 1 B に示される、特許請求の範囲第 1 4 項記載の DNA 配列。

(15) オキシドリダクターゼをコードする構造遺伝子および特定の微生物又はある群の微生物中構造遺伝子の発現を調節する 1 種以上の別の DNA 配列を含む、DNA 配列の組み合わせ。

(16) 第 1 1 A 図に示した上流 DNA 配列 - 1 から約 - 1 5 0 0 の少なくとも一部および / 又は第 1 1 B 図に示した下流 DNA 配列 1 9 9 3 から約 3 2 6 0 (MOX 遺伝子の制御領域) の少なくとも一部を含む、特許請求の範囲第 1 6 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(17) 第 1 1 A 図に示した上流 DNA 配列の少なくともポリヌクレオチド - 1 0 5 2 から - 9 8 7 を含

む、特許請求の範囲第 2 0 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(22) 真核生物、カビ又は酵母のオキシドリダクターゼをコードする構造遺伝子を含む、特許請求の範囲第 1 6 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(23) ハンセンラ属、望ましくは B. ポリモर्फアの酵母のオキシドリダクターゼをコードする構造遺伝子を含む、特許請求の範囲第 2 3 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(24) オキシドリダクターゼをコードする構造遺伝子はアルコールオキシダーゼをコードする、特許請求の範囲第 1 6 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(25) 構造遺伝子はポリペプチド 1 - 6 6 4 (MOX) をコードする第 1 1 A 図 + 1 1 B 図に示した DNA 配列 1 - 1 9 9 2 (MOX 遺伝子) であり、そのアミノ酸配列は第 1 1 A 図 + 1 1 B 図に示される、特許請求の範囲第 2 5 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(26) DHAS をコードする構造遺伝子を含む、特許請求の範囲第 1 6 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

む、特許請求の範囲第 1 7 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(28) 第 1 1 A 図に示した少なくともポリヌクレオチド - 1 0 5 2 から - 9 8 7 の欠失により得ることができる変性 MOX プロモーター配列を含む、特許請求の範囲第 1 7 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(29) 第 1 8 A 図 + 1 8 B 図に示した上流 DNA 配列 - 1 から約 - 2 1 2 5 の少なくとも一部および / 又は第 1 8 C 図に示した下流 DNA 配列 2 1 0 7 から約 2 3 5 0 の少なくとも一部 (DAS 遺伝子の制御領域) を含む、特許請求の範囲第 1 6 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(30) 第 1 8 A 図に示した上流 DNA 配列の少なくともポリヌクレオチド - 1 0 7 6 から - 9 3 7 を含む、特許請求の範囲第 2 0 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(31) 第 1 8 A 図に示した少なくともポリヌクレオチド - 1 0 7 6 から - 9 3 7 の欠失により得ることができる変性 DAS プロモーター配列を含む、特

許請求の範囲第 2 7 項記載の DNA 配列の組み合わせ。

(32) 組換え DNA 技術により、DNA 配列を変性し、オキシドリダクターゼをコードする機能又はその制御機能を保持する、特許請求の範囲第 1 6 項から第 2 8 項のいずれか 1 項に記載の DNA 配列の組み合わせ。

(33) ある特定の宿主微生物の後代に上記組み合わせを安定的に遺伝させうる 1 種以上の DNA 配列を含む、特許請求の範囲第 1 6 項から第 2 9 項のいずれか 1 項に記載の DNA 配列の組み合わせ。

(34) 特異的酵素又はその他のタンパク質を産生するのに微生物宿主の形質転換に適する DNA 配列の組み合わせで、その DNA 配列の組み合わせはレギュロン、その特異的酵素又はその他のタンパク質をコードする構造遺伝子および任意にはターミネーターを含む組み合わせであつて、レギュロンは第 1 1 A 図に示す MOX 遺伝子のレギュロン - 1 から



約-1500の少なくとも一部又は第18A図に示すDAS遺伝子のレギュロン-1から約-2125の少なくとも一部から成る群から選んで使用し、その修飾はレギュロン機能に修復を与えず、そして任意にはターミネータは第11B図に示すMOX遺伝子のターミネータ1993から約3260の少なくとも一部又は第18B図に示すDAS遺伝子のターミネータ2110から約2350の少なくとも一部から成る群から選択して使用し、その修飾はターミネーター機能に修復を与えないことを特徴とする、上記DNA配列の組み合わせ。

③① ハンセンラ酵母、特にハンセンラ・ポリモーフアの形質転換に適する、特許請求の範囲第31項記載のDNA配列の組み合わせ。

③② サツカロミセス酵母、特にサツカロミセス・セレビシエの形質転換に適する、特許請求の範囲第31項記載のDNA配列の組み合わせ。

③③ 特異的酵素又は他のタン白質をコードする構造遺伝子は、その特異的酵素又はその他のタン白質がペルオキシソームすなわちこの微生物宿主の

(DAS遺伝子)および第18A+18B図に示す上流DNA配列-1から約-2125の少なくとも一部および/又は第18C図に示す下流DNA配列2107から約2350の少なくとも一部(DAS遺伝子の制御領域)および/又は第11A図に示す上流DNA配列-1から約-1500の少なくとも一部および/又は第11Bに示す下流DNA配列1993から約3260の少なくとも一部(MOX遺伝子の制御領域)から成る、特許請求の範囲第37項記載のDNA配列の組み合わせ。

③④ 第18A図に示す上流DNA配列の少なくともポリヌクレオチド-1076から-937又は第11A図に示す上流DNA配列の少なくともポリヌクレオチド-1052から-987をそれぞれ含む、特許請求の範囲第38項記載のDNA配列の組み合わせ。

③⑤ 適当な条件下で微生物を培養し、任意にはポリペプチドを濃縮しそして公知方法でそれを集取することにより、タン白質や酵素の如きポリペプチドを製造する方法において、組換えDNA技術に

同一マイクロボディにトランスロケーションするように、その機能を修復せず、この特異的酵素又はその他のタン白質を修飾するMOX(第11A+11B図)をコードする構造遺伝子由来のDNA配列を含む、特許請求の範囲第31項記載のDNA配列の組み合わせ。

③⑥ ジヒドロオキシシンターゼ酵素をコードするDNA配列であつて、天然のDNAおよび/又はcDNAおよび/又は化学合成したDNAから組換えDNA技術により得ることができる、上記DNA配列。

③⑦ ポリペプチド1-702(DHAS)をコードする、第18B+18C図に示すDNA配列1-2106(DAS遺伝子)を有し、そのアミノ酸配列は第18B+18C図に示す、特許請求の範囲第35項記載のDNA配列。

③⑧ 特定の微生物又は微生物群に構造遺伝子の発現を調節する1種以上のDNA配列およびジヒドロオキシアセトンシンターゼ酵素をコードするDNA配列の組み合わせ。

③⑨ 特許請求の範囲第36項記載のDNA配列

より得、かつこのポリペプチドをコードする構造遺伝子を有する微生物を使い、その構造遺伝子の発現はレギュロンの調節下で行ない、そのレギュロンはプロモーターおよびハンセンラ・ポリモーフアCBS4732のMOX遺伝子の少なくとも-1052から-987又はハンセンラ・ポリモーフアCBS4732のDAS遺伝子の-1076から-937領域、又は他のメチルトロフィックのカビ又は酵母の相当する領域、又はこれらの任意の領域の有効修飾から成ることを特徴とする、上記ポリペプチドの製造法。

④① プロモーターはハンセンラ・ポリモーフア由来である、特許請求の範囲第40項記載の方法。

④② 微生物はカビ又は酵母である、特許請求の範囲第40項又は第41項記載の方法。

④③ カビ又は酵母はアスペルギルス属、カンジダ属、ジオトリカム属、ハンセンラ属、レンジト属、ナドソニア属、ピチア属、ポリア属、ポリボラス属、サツカロミセス属、スポロボロミセス属、トルオプシス属、トリコスボラ属およびゼンデラ属

から選択する、特許請求の範囲第 40 項から第 42 項のいずれか 1 項に記載の方法。

(43) カビ又は酵母はアスペルギルス・ジヤポニカス、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・オリゼ、カンジダ・ボイジニ、ハンセンラ・アノマラ、ハンセンラ・ポリモーフア、ハンセンラ・ウインゲイ、クロツケラ sp. 2201 およびピチア・パストリスから選択する、特許請求の範囲第 43 項記載の方法。

(44) 微生物はハンセンラ・ポリモーフアである、特許請求の範囲第 44 項記載の方法。

(45) 構造遺伝子は、遺伝子産物をペルオキシソームすなわち微生物宿主の均等マイクロボディにトランスロケーションする 1 種以上の DNA 配列を有する、特許請求の範囲第 40 項から第 45 項のいずれか 1 項に記載の方法。

(46) DNA 配列は MOX 遺伝子又はペルオキシソームすなわちマイクロボディに MOX トランスロケーションするその一部から成る、特許請求の範囲第 46 項記載の方法。